



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da qPCR para determinação de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Isoniazida e à Rifampicina em amostras de escarros de pacientes multibacilares com Tuberculose pulmonar

SUELEN ENNES DAS NEVES

MANAUS-AMAZONAS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SUELEN ENNES DAS NEVES

Avaliação da qPCR para determinação de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Isoniazida e à Rifampicina em amostras de escarros de pacientes multibacilares com Tuberculose pulmonar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Co- orientador: Doutor Mauricio Morishi Ogusku



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Candidata: SUELEN ENNES DAS NEVES

Título: Avaliação da qPCR para determinação de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência à Isoniazida e à Rifampicina em amostras de escarros de pacientes multibacilares com Tuberculose pulmonar

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Co- orientador: Doutor Mauricio Morishi Ogusku

() APROVADO

() NÃO APROVADO

Professora Doutora Aya Sadahiro (ICB/UFAM)
(Presidente)

Professor Doutor João Vicente Braga de Souza
(Membro Titular)

Professora Doutora Marlúcia da Silva Garrido
(Membro Titular)

À minha irmã *Sumara Ennes das Neves*, meu outro pedaço, meu orgulho, meu exemplo. Pelo carinho, amor, amizade e principalmente o incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Ildenir**: “É você meu lugar quando tudo por um fio está”

Ao meu pai **Raimundo e sua esposa Dolores**. Pelo apoio e incentivo nas minhas decisões pessoais e profissionais.

À minha irmã **Sudhávea Neves** (*in memoriam*). Minha estrela, meu eterno amor.

À Doutora **Aya Sadahiro**, minha “mãe científica”, pela oportunidade, compreensão, conhecimento e confiança na orientação, que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Obrigada por confiar em mim!

Ao Doutor **Mauricio Morishi Ogusku**, meu co-orientador, pela paciência e auxílio em toda metodologia e escrita dessa dissertação.

À minha amiga **Marne Carvalho de Vasconcellos** pela amizade e incentivo.

A banca examinadora da aula de qualificação composta pela **Doutora Marlúcia Silva Garrido**, Doutor **João Vicente Braga de Souza** e Doutor **José Pereira de Moura Neto**.

À **Cleo**, secretária da Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas.

A todos os professores do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento adquirido.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de mestrado.

À equipe da Policlínica Cardoso Fontes, em especial à técnica **Elenilda Ramos** que, apesar das dificuldades, dedica-se ao bem estar dos pacientes com Tuberculose, à Doutora **Irineide Assumpção Antunes**, à **Doutora Joycenéa Matsuda da Silva**, às Enfermeiras **Sherly** e **Cimara**, a ao Laboratório de Análises Clínicas da Policlínica pela receptividade e disposição na ajuda da seleção dos pacientes.

À equipe técnica do laboratório de Micobacteriologia do INPA, *Francisco Farias de Carvalho, Raimundo Bezerra do Nascimento, Maísa Porto dos Santos, João Raimundo S. de Souza e Fernanda O. do Nascimento* pela ajuda nas técnicas, na esterilização e preparação de materiais e reagentes.

Ao coordenador do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM- INPA) *Doutor Adalberto Luis Val* e à *Maria de Nazaré Paula da Silva* por dispor do referido laboratório para as análises das amostras desta pesquisa.

À equipe técnica do Laboratório Multiusuário de Genômica do HEMOAM, *Alysson, Andréa e Nadja* pela receptividade, ensino e apoio para a realização de uma parte deste trabalho.

À colega *Renatha Freitas*, que me acolheu ao Laboratório de Micobacteriologia e pela sua disposição em me apresentar a Biologia Molecular.

Aos meus colegas do INPA *Dhêmerson Souza de Lima* e *Vanessa Alves de Almeida* que sempre se dispuseram a ajudar.

Aos meus amigos do Mestrado, *Michele Santos, Ledjane Santos, Jaqueline Siqueira, Jakeline Pinheiro, Túlio Azevedo, Ana Jacqueline Coelho e Rildo Lima* que sempre se propuseram a me ajudar nos momentos mais difíceis, com palavras, ideias e companheirismo. Família que o mestrado que forneceu de presente.

Às minhas amigas *Karina Fontenele, Anne Caroline Neves, Anne Jaqueline Neves, Rayka de Araújo Augusto, Emili Fátima Brigolla Silva, Ana Priscila Alencar* pelas palavras de perseverança.

À **Simone Russo**, por me fazer descobrir que posso ir além.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente, os meus mais sinceros agradecimentos.

Se soubermos que um obstáculo é
intransponível, deixa de ser um
obstáculo para se tornar um ponto
de partida (József Eotvos).

RESUMO

A detecção precoce de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose (TB), a partir de isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, representa um desafio aos Programas de Controle de Tuberculose (PCT), pois a maioria dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos necessita do isolamento do bacilo em meio de cultivo. Os métodos moleculares apresentam maiores possibilidades de determinação rápida da resistência, eles visam detectar mutações em genes de *M. tuberculosis* associados à resistência aos antimicrobianos e possuem resultados promissores para Isoniazida e Rifampicina, que são os principais fármacos do esquema terapêutico básico de tratamento da TB. O presente estudo avaliou o desempenho do ensaio PCR em Tempo Real (qPCR), diretamente de amostras de escarro e de isolados de cultivo de pacientes com TB pulmonar multibacilares, oriundos da Policlínica Cardoso Fontes. Foram analisadas 171 amostras por qPCR, tendo como alvo os genes: *katG*, *inhA* e *rpoB* e os resultados comparados com o Método de Nitrato Redutase (MNR). A frequência de resistência para as amostras avaliadas foi de 9,36% para Isoniazida, 5,85% para Rifampicina e 4,09% para ambos os fármacos. Os genes *katG* e *rpoB* foram associados a resistência a Isoniazida ($p=0,0001$; IC95% 3,61 a 21,01) e a Rifampicina ($p=0,0001$; IC95% 6,34 a 51,05), respectivamente. O gene *inhA* não apresentou associação a resistência a Isoniazida. Houve concordância aceitável entre ensaio fenotípico, MNR, e o qPCR (de amostras de escarro) para a detecção da mutação para os genes *katG* (Índice *kappa*: 0,4097) e *rpoB* (Índice *kappa*: 0,4985). Os genes selecionados *katG* e *rpoB* foram associados a resistência a Isoniazida e Rifampicina respectivamente, embora a qPCR tenha tido um desempenho inferior ao MNR neste estudo. Todavia, os testes moleculares continuam como alvos promissores para obtenção de resultados mais rápidos. Neste contexto, otimizações nos testes moleculares devem ser realizadas, para permitir diagnósticos mais rápidos e confiáveis para resistência aos fármacos anti-TB e, desta forma, proporcionar um tratamento adequado ao paciente e reduzir a transmissão da TB.

Palavras-Chave: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR em Tempo Real, resistências aos fármacos.

ABSTRACT

Early detection of resistance to drugs used to treat tuberculosis (TB) from *Mycobacterium tuberculosis* isolates, represent a challenge to Tuberculosis Control Program (TCP), because most antimicrobial susceptibility testing needs bacillus isolation in growth medium. Molecular methods have greater possibilities for rapid determination of resistance, they aim to detect mutations in *M. tuberculosis* genes associated with antimicrobial resistance and have promising results for Isoniazid and Rifampin, which are the major drugs of basic therapeutic regimen for TB treatment. This study evaluated the performance of PCR assay in Real Time (qPCR), directly by sputum samples and cultivation of strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis multibacillar from Polyclinic Cardoso Fontes. 171 samples were analyzed by qPCR, targeting genes: *katG*, *inhA* and *rpoB* and the results were compared using the Nitrate Reductase Method (MNR). The resistance frequency for the evaluated samples was 9.36 % for Isoniazid , 5.85% for Rifampin and 4.09 % for both drugs. The *katG* and *rpoB* genes were associated with resistance to Isoniazid ($p = 0.0001$, 95% CI 3.61 to 21.01) and to Rifampin ($p = 0.0001$, 95% CI 6.34 to 51.05), respectively . The *inhA* gene was not associated with resistance to Isoniazid. There was acceptable agreement between phenotypic assay, MNR, and qPCR (sputum samples) for mutation detection for *katG* genes ($kappa$ index: 0.4097) and *rpoB* ($kappa$ index: 0.4985). The selected genes *katG* and *rpoB* were associated with resistance to Isoniazid and Rifampin respectively, although the qPCR has had underperformed the MNR in this study. However, the molecular tests continue as promising targets for achieving faster results. In this context , optimizations in molecular testing should be performed to allow faster and more reliable diagnostics for resistance to anti -TB drugs and thus provide an appropriate treatment for the patient and reduce the transmission of TB.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Taxas estimadas de incidência de TB em 2014.....	19
FIGURA 2 - Bacilos álcool-ácido resistente (coloração Kinyoun).....	23
FIGURA 3 - Estrutura da parede celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
FIGURA 4 - Fases da infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
FIGURA 5 - Esquema representativo dos mecanismos de ação dos fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose.....	27
FIGURA 6 - Estrutura química da isoniazida.....	31
FIGURA 7 - Mecanismo de ação da isoniazida.....	32
FIGURA 8 - Estrutura química da rifampicina.....	33
FIGURA 9 - Fluxograma das atividades.....	44
FIGURA 10-. Frequência da Resistência à Isoniazida e à Rifampicina, em isolados de <i>M. tuberculosis</i> , a partir de amostras de escarro, de pacientes com TB pulmonar.....	54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - Mecanismo de ação dos fármacos e os genes associados na resistência a <i>M. tuberculosis</i>	34
QUADRO 2 - Parâmetros de amplificação para a PCR IS110.....	45
QUADRO 3 - Primers e sondas para amplificação do gene, sequenciamento e PCR em Tempo Real.....	49
TABELA 1 - Esquema básico de tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes (2RHZE/4RH).....	28
TABELA 2 - Características gerais dos pacientes de Tuberculose (TB) pulmonar, com diagnóstico laboratorial positivo para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	53
TABELA 3 - Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes <i>katG</i>	55
TABELA 4 – Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes <i>inhA</i>	55
TABELA 5 – Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes <i>rpoB</i>	57
TABELA 6- Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes <i>katG</i>	56
TABELA 7 – Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir da cepa), para mutações dos genes <i>inhA</i>	56
TABELA 8 - Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes <i>rpoB</i>	57
TABELA 9 - Distribuição dos resultados qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para mutações dos genes <i>katG</i>	61
TABELA 10 - Distribuição dos resultados do teste qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para mutações dos genes <i>inhA</i>	61
TABELA 11 - Distribuição dos resultados pelo qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para mutações dos genes <i>rpoB</i>	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anti-TB	Anti-Tuberculose
CTA/PNCT/MS	Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde
CDC	Centers for Disease Control
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
KNO₃	Nitrato de Potássio
LACEN	Laboratório Central do Estado
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDT-TB	Tuberculose multirresistente
MNTB	Micobactérias não tuberculosas
MRN	Método de Redução de Nitrato
MS	Ministério da Saúde
KNO₃	Nitrato de Potássio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PGL	Peptídeoglicano
SEMSA	Secretaria Municipal de Saúde
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
q PCR	PCR em Tempo Real
TB	Tuberculose
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	19
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.3. TRANSMISSÃO	24
2.4. SINTOMATOLOGIA	26
2.5. TRATAMENTO	26
2.6. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	28
- Isoniazida.....	29
- Rifampicina.....	33
2.7. MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA	34
2.7.1. INNO-LIPA Rif TB.....	35
2.7.2. GenoType MTBDRplus.....	35
2.7.3. Gene Xpert TM MTB/RIF.....	36
2.7.4. Sequenciamento de DNA.....	37
2.7.5. DNA – Microarray.....	37
2.7.6. PCR em Tempo Real (qPCR).....	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Geral	40
3.2. Específicos	40
4. METODOLOGIA	42
4.1. Modelo de estudo	42
4.2. Aspectos Éticos e de Financiamento	42
4.3. Universo do Estudo	42
4.3.1. Participantes e Critérios de Elegibilidade.....	42
4.3.2. Critérios de Exclusão.....	43

4.3.3. Organização do Experimento.....	44
4.4. Procedimentos Micobacteriológicos.....	45
4.5. Identificação de <i>M. tuberculosis</i> por PCR.....	45
4.6. Teste de Sensibilidade ao Fármacos.....	46
4.7. Técnicas Moleculares para Determinação dos Genes de Resistência.....	47
4.7.1. Extração de DNA a partir de amostras de cultivo bacteriano.....	47
4.7.2. Extração de DNA a partir de amostras de escarro.....	47
4.7.3. PCR em Tempo Real (qPCR).....	48
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Características dos pacientes de TB pulmonar inclusos no estudo.....	53
5.2. Resultado da frequência da sensibilidade e resistência aos fármacos Isoniazida e Rifampicina.....	54
5.3. Análise de Associação dos genes <i>katG</i>, <i>inhA</i> e <i>rpoB</i> para resistência aos fármacos anti-TB.....	54
5.3.1. Análise de Associação dos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> para a resistência à Isoniazida.....	56
5.3.2 Análise de Associação do gene <i>rpoB</i> para resistência a Rifampicina.....	56
5.4. Análise de concordância entre a PCR em Tempo Real (qPCR), de amostra de escarro e isolados de cultivo, e o Método de Redução de Nitrato (MRN).....	57
5.4.1. Análise de concordância entre a qPCR de amostras de escarro (qPCR-E) e MRN.....	58
5.4.2. Análise de concordância entre a qPCR de isolados de cultivo (qPCR-C) e MRN.....	59
5.4.3. Análise de concordância entre os testes de qPCR-E e qPCR-C.....	60
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	70
9. APÊNDICE.....	81
10. ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é considerada como uma das doenças infecciosas mais antigas da humanidade e permanece, ainda, como um importante problema de saúde pública mundial, devido à sua ampla dispersão geográfica, ao aumento de casos multirresistentes e à coinfeção com o HIV (WHO, 2011).

A resistência aos medicamentos anti-tuberculose (anti-TB) é um desafio importante no controle mundial da TB. As mutações na estirpe selvagem de *M. tuberculosis*, que provocam a ocorrência natural da resistência, tornaram-se clinicamente significativas sob pressão de seleção a partir do uso indevido de fármacos anti-TB. (CAMINERO, 2013). Cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes podem ser transmitidas entre os indivíduos, contribuindo para a disseminação da doença (CAMPOS et al. 1999).

Apesar dos esquemas multidrogas adotados, cada vez mais é frequente o desenvolvimento de cepas de *M. tuberculosis* multidroga resistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR) aos medicamentos usados para tratar a TB e, frequentemente, a co-infecção com HIV complica ainda mais o atendimento ao paciente e prognóstico (Souza et al. 2006; Lew et al. 2011).

Portanto, a resistência do *M. tuberculosis* esta relacionada com mutações em genes importantes para a sobrevivência da bactéria (GILLESPIE, 2002; TENOVER, 2006) sendo a presença de fármacos antituberculoses um importante papel na seleção destas famílias resistentes (PINHEIRO, 2008).

A Rifampicina (RMP) e a Isoniazida (INH) são dois importantes fármacos essenciais no esquema de tratamento para a TB. A forma clínica de TB com bacilos resistentes à RMP e à INH foi conceitualmente denominada de tuberculose multirresistente (MDR-TB) (DALCOMO et al., 2007). O uso inadequado dos medicamentos contribui para o desenvolvimento da resistência, e prejudica a efetividade do tratamento.

O estado do Amazonas apresenta a maior taxa de incidência (70,1) da doença na região norte, com 3.709 casos registrados no ano de 2015. Conforme os dados divulgados pela Secretaria Municipal de Saúde (BRASIL, 2016).

Devido à TB ser uma doença de emergência de saúde pública mundial, surgem esforços que visam a melhorar o diagnóstico e o tratamento de indivíduos doentes (WHO, 2012).

Como exemplo desse empenho tem-se a busca pela detecção precoce da resistência de *M. tuberculosis*, informação imprescindível para garantir um tratamento apropriado ao paciente, conseqüentemente reduzindo a transmissão de bacilos resistentes.

Os métodos mais comuns para o diagnóstico da TB em todo o mundo são: o exame direto (baciloscopia) e a cultura (considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico). Porém, a baciloscopia de escarro tem sensibilidade média em 40-60% (JACOMELLI et al., 2012) e a cultura pode levar de 3 a 6 semanas para se obter um resultado. Nesse contexto, a utilização dos métodos moleculares, é importante porque apresenta possibilidades de determinação rápida da resistência (STEINGART et al., 2006; YANG et al., 2005). O método da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) amplamente utilizada em laboratórios de biologia molecular, tem possibilidade para a detecção de micobactérias. Dentre as vantagens da qPCR estão: a capacidade da técnica em monitorar a amplificação em tempo real, a rapidez de obtenção dos resultados, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia a simplificação do processo envolvido na finalização do ensaio (COUTO-SANT’ANNA et al., 2004). Além disso, há minimização da contaminação ambiental sem a necessidade de manipulação do tubo durante o processamento e da ampliação do número de amostragem a ser analisada. (BUSTIN, 2000; MARRAS, 2008).

Portanto, o diagnóstico preciso e precoce de TB, principalmente, dos casos de resistência aos fármacos é uma necessidade ou uma condição essencial para o controle da doença. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a PCR em tempo Real para detecção de genes em *M. tuberculosis*, associados à resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença que acompanha desde o início da história da humanidade. Embora tenha cura, atualmente permanece como uma das maiores causas de doença e morte na população mundial, sobretudo na Ásia e África. Trata-se de uma doença infecciosa com as maiores taxas de mortalidade em adultos, onde a maioria dos casos ocorre na população economicamente produtiva (WHO, 2011) em virtude da ampla dispersão geográfica, emergência de casos multirresistentes e coinfeção com HIV (LÖNNROTH et al., 2009). A situação é agravada pela emergência de cepas multidrogarresistentes (MDR) e as extremamente resistentes (XDR) aos medicamentos contra o *M. tuberculosis* (SANKAR et al, 2011).

De acordo com o relatório divulgado no final de outubro de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) havia informado que a tuberculose conseguiu superar a AIDS como doença infecciosa mais mortal do mundo em 2014. Ainda que a taxa de mortalidade represente quase a metade daquela verificada em 1990, as estimativas apontam que a doença matou 1,5 milhão de pessoas em 2014, contra 1,2 milhão de vítimas do HIV (OMS, 2016).

Foram relatados 9,6 milhões de novos casos de TB em 2014. A doença respondeu pelas mortes de 890 mil homens, 480 mil mulheres e 140 mil crianças. Dos 1,5 milhão de pessoas mortas por TB em 2014, 400 mil eram HIV-positivos, segundo a OMS, 2016. (Figura 1).

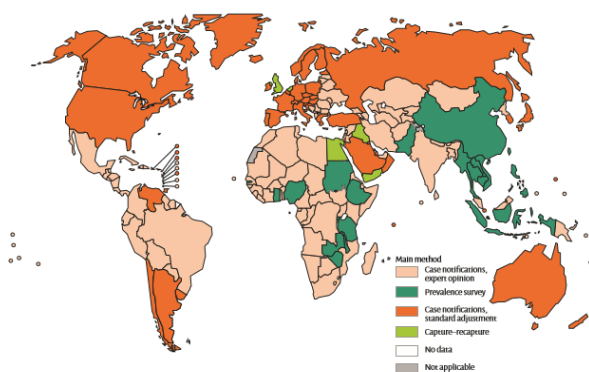


Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB em 2014.
Fonte: Adaptado de WHO (2015).

A Organização Mundial da Saúde (2010b) estima que um terço da população mundial encontra-se infectada pelo *M. tuberculosis*. Destes, cerca de 10% dos indivíduos (nove milhões desenvolvem a tuberculose ativa; 5 mil morrem diariamente e 3,0 milhões anualmente, atingindo principalmente os jovens e adultos em idade produtiva). O número de mortes por TB é inaceitavelmente grande, dado que a maioria dos casos seria evitável se a população fosse devidamente esclarecida; se os programas de saúde funcionassem a contento e apresentassem resultados satisfatórios quanto à detecção precoce da doença (WHO, 2014).

A relação entre pobreza e tuberculose está muito bem documentada pelas estatísticas apresentadas, levando em consideração os seguintes indicativos: o desemprego, as condições precárias de moradia, alimentação e educação, o aumento da imigração, o envelhecimento da população mundial, a transmissão ativa nos ambientes de aglomeração humana (como prisões, asilos, hospitais e abrigos para mendigos) e a elevada taxa de abandono ao tratamento, além da degradação dos sistemas de saúde (GUIMARÃES et al., 2012; BLOOM, 1992; BRASIL, 2012; FATKENHEUER et al., 1999).

O Plano Global para o Combate da Tuberculose 2011-2015 (*The Global Plan to Stop Tuberculosis 2011-2015*) da OMS teve como objetivo livrar o mundo da TB. A proposta era reduzir drasticamente a carga da doença até 2015, quando comparados aos valores de 1990 (BRASIL, 2012). Felizmente os esforços foram satisfatórios e alcançaram globalmente a redução dos casos de TB em 16 dos 22 países de alta carga. A incidência de TB no mundo caiu 1,5% ao ano desde 2000, com uma redução total de 18,0% (BRASIL, 2016).

O Brasil ocupa a 18ª posição entre os 22 países considerados de alta carga de TB, representando 0,9% dos casos estimados no mundo e 33,0% dos estimados para as Américas. Os coeficientes de mortalidade e de incidência da TB foram reduzidos em 38,9% (3,6 para 2,2/100 mil habitantes) e 34,1% (51,8 para 34,1/100 mil habitantes), respectivamente, de 1990 até 2014 (BRASIL, 2016; WHO, 2013).

Em 2015, foram notificados 23.161 casos de TB, o que corresponde a 36,6% do total do país. As capitais do Amazonas, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Rio de Janeiro destacaram-

se por apresentarem coeficientes de incidência que excederam o valor nacional. Até o momento da elaboração do Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde, em fevereiro de 2016, haviam sido diagnosticados e registrados, em 2015, 63.189 casos novos de tuberculose no Brasil (BRASIL, 2016)

Na cidade de Manaus o crescimento desordenado, com carência de infraestrutura e sem planejamento urbano, favoreceu o aumento da pobreza. Isso foi fator determinante para maior transmissão da TB e de outras doenças infecciosas na cidade (SOUZA et al., 2009).

De acordo com os dados do Ministério da Saúde (2016), em 2015 foi registrado em Manaus 2.806 casos de TB. Esse alto número elege a cidade com a maior taxa de ocorrência de casos de TB no país, resultando em um coeficiente de incidência de 98,3 casos por 100 mil habitantes, quando a média nacional é de 38,7 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2016).

O aumento do registro reflete também os altos índices de abandono ao tratamento por parte dos pacientes (17,0%). A falta de adesão e o abandono ao tratamento são os principais obstáculos para o controle da TB. Assim, uma das metas primordiais no controle dessa doença é informar ao paciente sobre a gravidade dela, conscientizar da necessidade de um tratamento sério, continuado, sem abandonar o uso da medicação. O aumento das taxas de abandono do tratamento contribui para a maior disseminação do bacilo em razão de os doentes permanecerem como fontes de contágio, contribuindo para a resistência adquirida da terapia e o aumento do tempo e do custo do tratamento (SILVA et al., 2014). A resistência às drogas ocorre, principalmente, devido a prescrições inadequadas ou ao descumprimento da prescrição médica (irregularidade ou abandono do tratamento) (SANKAR et al, 2011).

A descoberta de medicamentos com ação rápida e eficaz contra *M. tuberculosis* seria uma alternativa para reduzir o tempo de tratamento e, conseqüentemente, levar à diminuição dos casos de resistência aos fármacos. O período prolongado de tratamento que resulta na dificuldade de aderência aos esquemas terapêuticos, promove a transmissão da doença e, conseqüentemente, conduz o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes (BRASIL, 2010). A avaliação da quimioterapia no sentido de fornecer um meio mais rápido com poder

de determinar se o esquema terapêutico é apropriado para o paciente, é importante devido ao aumento de cepas prevalentes multirresistentes do *M. tuberculosis* (MDIVANI et al., 2009).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO – *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* pertence à família Mycobacteriaceae e composta por um número crescente de novas espécies. Até o momento são reconhecidas 183 espécies (incluindo 13 subespécies) distribuídas pelos ambientes do mundo, causando diversas doenças ao homem. Essas espécies são agrupadas em complexos devido à similaridade genética e ao fato de causarem o mesmo espectro de doenças (EUZÉBY, 2012; DUCATI et al., 2006). A TB pode ser causada por qualquer uma das sete espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Entretanto, do ponto de vista sanitário, a espécie mais importante é *M. tuberculosis* (<http://portalsaude.saude.gov.br>).

O bacilo da TB (FIGURA 2), agente etiológico da doença, foi identificado por Robert Koch em 1882. É um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não capsulado, aeróbio estrito, cujo único reservatório é o ser humano (BARREIRA et al., 2007). É sensível ao calor e a luz solar com um comprimento de 2 a 5 µm. É considerado um parasita intracelular facultativo, capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, onde estabelece a sua infecção, preferencialmente, nos pulmões, que normalmente condiciona-se a um estado de latência, enquanto o sistema imunológico do hospedeiro prevalece e mantém a infecção sob controle (CAMPOS, 2006).

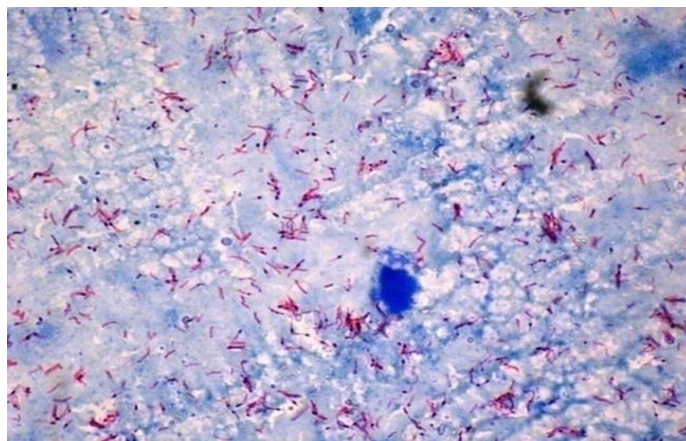


Figura 2 – Bacilos álcool-ácido resistente (coloração Kinyoun)
Foto: Dra. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto

É considerada uma micobactéria não pigmentada, álcool-ácido resistente, de crescimento lento, cujo tempo de geração de 14 a 20 horas, tanto em meio artificial quanto em organismos animais. Dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio, são necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis no meio de cultura; dentro do macrófago pode se multiplicar a cada 25-32 horas (KRITSKI et al., 2005; DUCATI et al., 2006). Algumas características dessas micobactérias, como coloração, resistência ao álcool-ácido, resistência a drogas, patogenicidade e taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica de sua parede celular (TORTORA et al., 2005).

A estrutura da parede celular é típica de uma bactéria Gram-positiva (FIGURA 3), com uma membrana interna recoberta por uma camada espessa de peptídeoglicano (PGL) sem membrana externa, mas o esqueleto de PGL está covalentemente ligado a moléculas de ácido micólico-arabinogalactano, recoberto por lipídeos livres, glicolipídeos, polipeptídeos e lipoproteínas (MURRAY, 2009). As micobactérias conseguem resistir a situações adversas como o ressecamento e algumas drogas antimicrobianas não conseguem penetrar devido à peculiaridade de sua parede celular (TORTORA et al., 2005).

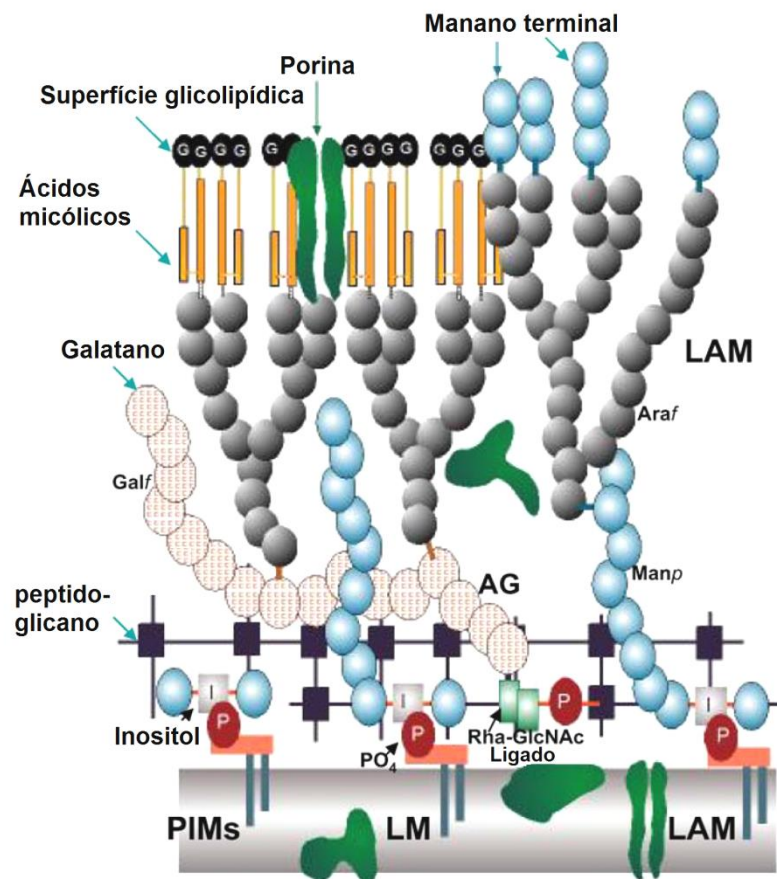


Figura 3 – Estrutura da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*
Fonte: Adaptado de Quesniaux et al. (2004).

2.3. TRANSMISSÃO

A TB é uma doença de transmissão aérea, ou seja, a infecção ocorre a partir da inalação de aerossóis. Ao falar, espirrar e, principalmente, ao tossir, as pessoas com TB ativa, denominadas de bacilíferas, lançam no ar partículas em forma de aerossóis que contêm bacilos, que ao serem inaladas por pessoas saudáveis induzem a infecção e podem evoluir para a doença (BRASIL, 2014). Calcula-se que, durante um ano, numa comunidade, um indivíduo que tenha baciloscopia positiva pode infectar, em média, de 10 a 15 pessoas (BRASIL, 2014). Porém, nem todos os indivíduos infectados com o bacilo irão desenvolver a doença, pois o sistema imune do indivíduo consegue impedir a sua evolução, que pode ficar em estado de latência por anos. As pessoas com TB infecção latentes não têm sintomas de TB e não são

contagiosas, mas eles estão em risco de desenvolver a doença ativa e se tornar infecciosos (WHO, 2014).

Entretanto, com o uso de tipagem molecular foi possível demonstrar que mesmo os pacientes com baciloscopia negativa e cultura positiva são responsáveis por 17,0 a 20,0% da transmissão da TB em determinada região, principalmente em grandes centros urbanos com elevada taxa de TB associada a outras comorbidades, como a infecção pelo HIV (BEHR et al., 1999). Tais dados têm sinalizado aos pesquisadores e gestores de políticas públicas de saúde a necessidade de avaliar outras técnicas de diagnóstico de TB, mais sensíveis que a baciloscopia e que forneçam resultados mais rápidos que a cultura de micobactérias, para ser utilizada como uma nova ferramenta para o controle da doença (FIGURA 4).

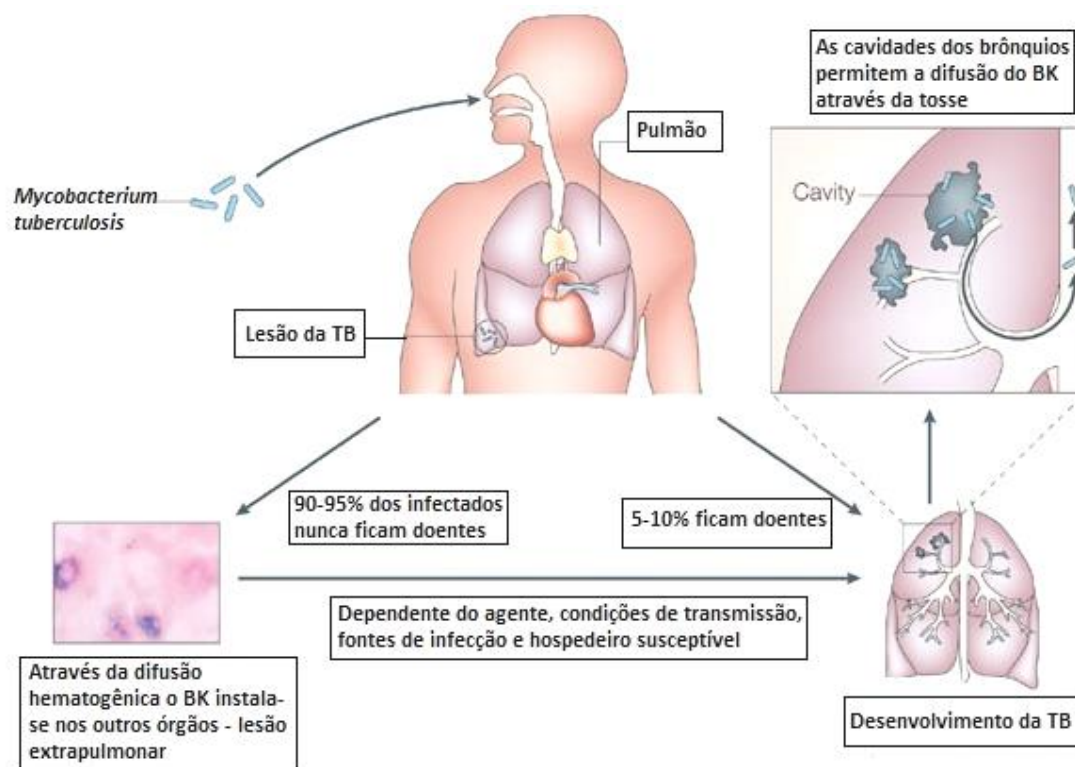


Figura 4 – Fases da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*
Fonte: Adaptado de WANI et al. (2013).

2.4. SINTOMATOLOGIA

As manifestações clínicas da TB são bastante variáveis e dependem de uma série de fatores inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro (imunodeficiência, desnutrição, entre outras) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Os sintomas da doença, na maioria dos casos, são inespecíficos e se agravam com o passar do tempo. Os principais são: tosse, cansaço, perda de apetite, suor noturno, fraqueza, emagrecimento e febre. Quando a doença atinge os pulmões, o indivíduo pode apresentar dor torácica e tosse produtiva, acompanhada ou não de escarros hemoptóicos. A tosse produtiva é o principal sintoma da forma pulmonar, que por sua vez é a forma mais frequente da TB. Em pacientes maiores de 15 anos, a doença atinge os pulmões em cerca de 80% dos casos; nos menores de 15 anos, esse percentual é de 85,0% (BRASIL 2014; CDC, 2012).

2.5. TRATAMENTO

Uma vez obedecidos os princípios da quimioterapia e a adesão ao tratamento, a TB, embora sendo uma doença grave, é curável em praticamente 100,0% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos antituberculosos. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o êxito no tratamento contra a TB (FIGURA 5). Isso evita o desenvolvimento de resistência aos fármacos e assegura, assim, a cura do paciente (BRASIL, 2010a).

Os fármacos utilizados no tratamento da TB podem ser divididos em duas categorias principais: os agentes de “primeira linha” compostos pelos antibióticos: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol. E os agentes de “segunda linha” compostos pelo: fluoroquinolonas levofloxacino e ofloxacino além dos bacteriostáticos de segunda linha etionamida, ácido para-aminosalicílico, cicloserina, capreomicina (BRUNTON ET al., 2006).

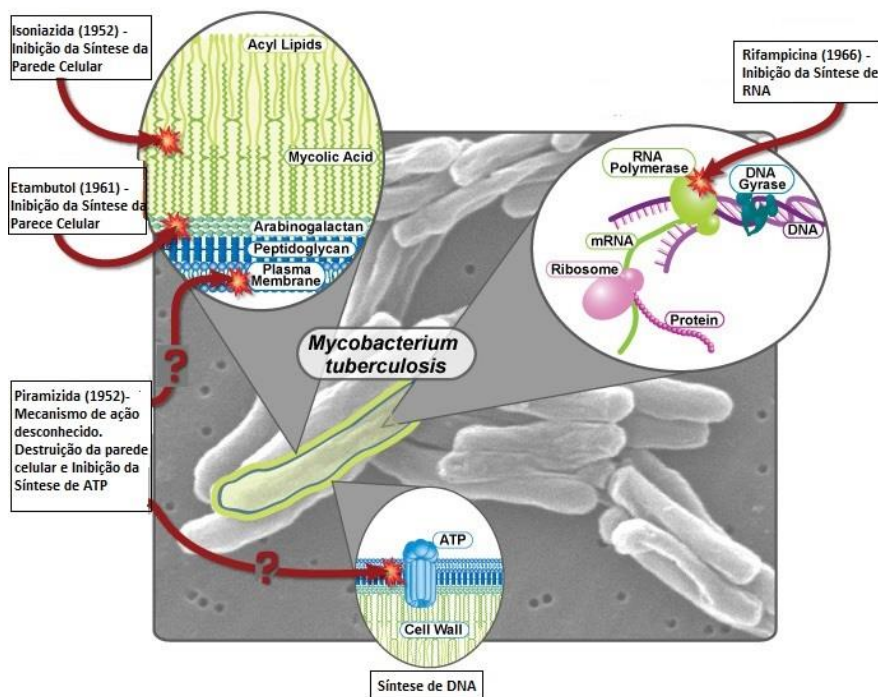


Figura 5 – Esquema representativo dos mecanismos de ação dos fármacos de primeira linha para o tratamento da TB.

Fonte: Adaptado de NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). <http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/Understanding/WhatIsTB/ScientificIllustrations/pages/newtdrugs.aspx>

No Brasil, desde 1979, o tratamento da TB é padronizado pelo Ministério da Saúde por meio de normas técnicas que regulamentam a dispensação da medicação a qual também é disponibilizada gratuitamente para todos os casos de TB (BRASIL, 2010).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor, emitiu uma nota técnica que modificou o sistema de tratamento da TB no Brasil, com base no aumento da resistência primária à Isoniazida (de 4,4% para 6,0%). Foi acrescentado, então, o Etambutol, na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema I que era composto por Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida. Esse esquema básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto de meningoencefalite), bem como para todos os casos de recidiva e de reingressos após abandono e de retratamento por abandono, exceto para menores de dez anos, devido ao risco de neurite óptica. Os menores de dez anos continuam utilizando o esquema RIP (CONDE et al., 2009; BRASIL 2010a).

TABELA 1 – Esquema Básico de Tratamento da TB em adultos e adolescentes (2RHZE/4RH)

ESQUEMA TERAPÊUTICO	FÁRMACOS	FAIXA PESO	DOSE	MESES
2 RHZE Fase Intensiva	RIF/INH/PZA/EMB 150/75/400/275mg comprimidos em dose fixa combinada	20Kg a 35Kg 36Kg a 50Kg >50Kg	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos	2
4 RH	RIF/INH 150/75mg Comprimidos	20 a 35Kg 36Kg a 50Kg .50KG	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos	4

Fonte: NOTA TÉCNICA Nº 03-2013/DEVIT/SVS/MS.

A apresentação farmacológica deste esquema passa a ser em comprimidos com dose fixa combinada dos 4 fármacos (Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida em 1 comprimido (4 em 1) para a fase intensiva do tratamento, e 2 em 1 (Rifampicina e Isoniazida), para a fase de manutenção (SBPT, 2009)

Para casos de pacientes multirresistentes, o esquema padronizado é composto de cinco fármacos: Estrptomicina, Etambutol, Ofloxacino, Pirazinamida e Terizidona na sua fase intensiva e mais três medicamentos na fase de manutenção: Etambutol, Ofloxacino e Terizidona. A Estreptomicina deverá ser utilizada por cinco dias da semana e nos dois primeiros meses, seguido de mais três vezes por semana durante quatro meses. O tratamento deverá ser supervisionado por uma unidade de referência terciária por dezoito meses.

2.6. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O surgimento da TB resistente é muitas vezes atribuído a falhas na implementação de programas de controle adequados para a TB e na gerência de forma adequada dos casos da doença (LEMOS et al., 2013).

As micobactérias são caracterizadas por um envelope celular altamente hidrofóbico que atua como uma barreira de permeabilidade para muitos componentes e possui um sistema de

efluxo de fármacos bem desenvolvido (ROSSETI, 2002). Um tempo de divisão celular mais longo, uma parede celular rica em lipídios e a presença natural de enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como as β -lactamases, aminoglicosídeo acetil transferases podem ser considerados fatores naturais de resistência de *M. tuberculosis* a certos antibióticos, como a penicilinas e sulfonamidas (KANDUMA et al., 2003, MURRAY et al., 2009; TENOVER, 2006). Além disso, o bacilo pode localizar-se em cavidades pulmonares ou dentro de células do sistema fagocitário em um estado de latência, o que impede a ação de fármacos que agem durante o processo de replicação celular (BARBOSA et al., 2003).

A aquisição de resistência a antimicrobianos por micobactérias é um evento aleatório, resultante de mutações espontâneas no cromossomo, que podem ser resultado da terapia de droga única ao tratamento ou diagnóstico incorreto (VALIM et al., 2000; SANTOS et al., 2010). É denominada de Resistência Natural quando independe do contato prévio do bacilo com a droga e geralmente ocorre com menor frequência.

Resistência Primária ou Resistência em Casos Novos ocorre em pacientes sem tratamento anterior, porém foram infectados com uma cepa resistente de *M. tuberculosis*. A Resistência Adquirida é a resistência em casos previamente tratados e advém principalmente de falhas ou abandono do tratamento, que permitem o surgimento e crescimento de cepas resistentes no curso da infecção (NACHEGA & CHAISSON, 2003).

O tipo mais comum da resistência aos medicamentos anti-TB pode ser a um único medicamento (monorresistência). No entanto, a resistência a múltiplos medicamentos podem ocorrer, sendo esta menos frequente, porém de maior preocupação. Por convenção, TB Multidroga Resistente (MDR-TB) é definido como resistência à Isoniazida e à Rifampicina, os dois principais fármacos usados no tratamento contra a doença e, TB Extensivamente Resistente a Droga (XDR-TB) é definida como resistência à Isoniazida, à Rifampicina (MDR), a uma fluoroquinolona e, pelo menos, a um agente de segunda linha injetável (amicacina, canamicina e/ou capreomicina) (NACHEGA & CHAISSON, 2003; WHO, 2010).

A resistência aos fármacos, de maneira geral, pode ser atribuída ao comportamento do paciente durante o uso de medicamentos prescritos; aos fatores intrínsecos ao sistema imune do paciente, à qualidade do fármaco e ao contágio com cepas resistentes. As mutações são mudanças na sequência dos nucleotídeos do DNA e elas envolvem troca, deleção ou inserção de nucleotídeos, promovendo o surgimento de uma sequência de DNA diferente da fita original (DUNNEN et al., 2000). Portanto, as mutações podem explicar a presença de bacilos resistentes em uma população de bacilos selvagens, que são bacilos que nunca entraram em contato com um determinado fármaco.

Os estudos realizados por Campos et al. (1999) apontam que cepas de *M. tuberculosis* resistentes são considerados um sério problema de saúde pública, por dois motivos principais: primeiro, há poucos fármacos efetivos disponíveis contra o bacilo de TB e uma infecção, por cepas resistentes, pode levar a uma doença potencialmente intratável; segundo, a TB é considerada uma doença altamente contagiosa, embora apenas 5 a 10% dos indivíduos infectados com o bacilo, podem vir a desenvolver a doença ativa. Portanto, um número crescente de doentes portadores de bacilos MDR se elevaria exponencialmente numa dada comunidade.

A ação dos dois principais medicamentos utilizados no esquema básico do tratamento da TB, e os principais aspectos sobre a resistência medicamentosa estão descritos a seguir:

- Isoniazida

Descoberta em 1952, a Isoniazida (Figura 6) ou hidrazina do ácido isonicotínico ainda é considerada um fármaco sintético primário efetivo contra a TB (ROSSETI et al., 2002). É o principal medicamento de primeira linha utilizado em todos os esquemas efetivos para o tratamento da doença, sendo recomendada tanto no tratamento profilático quanto na doença ativa da TB (TIMMINS et al., 2006, ZHANG & YEW, 2009).



Figura 6 – Estrutura química da Isoniazida

Fonte: Estrutura química desenhada com auxílio do programa “ChemWindow” 6.0 (Bio-Rad Laboratories).

A elevada potência da Isoniazida pode ser justificada devido ao fato de possuir vários alvos dentro da célula micobacteriana e, por difusão passiva, este fármaco entra no *M. tuberculosis* (TIMMINS et al., 2006). Exerce função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e bacteriostático, nos bacilos em repouso (ARBEX et al., 2010).

A Isoniazida é um pró-fármaco e sua função tuberculostática requer a ativação por *katG*, uma enzima com atividade de catalase e peroxidase para gerar radicais reativos que irão atuar em diversos alvos dos bacilos. O gene *katG* promove a remoção de dois elétrons da Isoniazida, tornando-a num intermediário ativo, portanto, mutações no gene *katG* podem resultar na incapacidade de ativação da pró-droga originando uma resistência a droga (Figura 6) (ZHANG& YEW, 2009).

Além das mutações no gene *katG*, outras mutações podem ocorrer afetando os alvos da droga que envolvem a resistência à Isoniazida, tais como nos genes de *inhA*, alterando atividades das proteínas carreadoras enoil-acil redutase, e também nos genes *kasA*, responsáveis por codificar a proteína β -cetoacil sintetase, que participam na síntese dos ácidos micólicos (ZHANG&YEW, 2009).

Adicionalmente, a Isoniazida inibe a *inhA*, uma adenina nicotinamida dinucleotídeo específica (NADH), que transporta proteínas acil-enoil redutase (ACP) envolvidas na síntese de ácidos graxos, resultando na perda da álcool-ácido resistência, provavelmente, como resultado da inibição da síntese de ácidos micólicos. Além disso, a proteína *inhA* estabelece uma ligação no seu local ativo com o NAD(H), utilizando-o como cofator. Por sua vez, a Isoniazida ativada liga-se covalentemente com o carbono 4 do NADH, do complexo *inhA*-NADH, na presença de oxigênio e magnésio, ocorrendo a inibição da síntese de ácidos micólicos (Figura 7) (TAKAYAMA et al., 1972; ZHANG, 2005; ANDRADE et al., 2008).

Ao contrário da resistência à Rifampicina, em que a maioria das mutações se concentra em uma pequena faixa de um gene, a resistência à Isoniazida é mais complexa, pois pode ocorrer mutações em vários genes como: *katG*, *inhA*, *kasA* e *ahpC*, sendo os dois primeiros genes os mais importantes (MOKROUSOV et al., 2002b, COHEN et al., 2003).

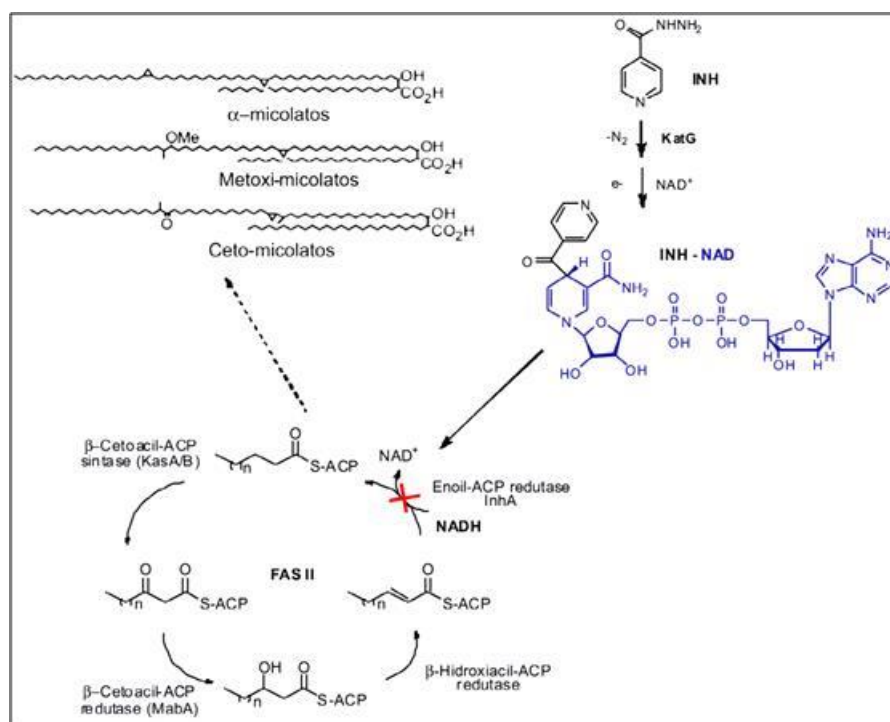


Figura 7 – Mecanismo de ação da Isoniazida.

Fonte: Adaptado de Andrade et al., (2008).

- Rifampicina

Em 1957, foi descoberta a Rifampicina (Figura 8), a partir do cultivo de uma cepa de *Streptomyces*, que foi denominada *Streptomyces mediterranei*, isolada pela primeira vez em 1963 (RIEDER, 2002). A Rifampicina foi introduzida na terapia anti-TB no início de 1970 e desde então é considerada um dos medicamentos de primeira linha mais importante para o tratamento (RIEDER, 2002). É uma droga bactericida que atua inibindo a subunidade β da RNA polimerase de bactérias, mas não de mamíferos, atuando no início da transcrição (SOUZA, 2005). A Rifampicina é a “chave” do esquema terapêutico, porém, alguns autores chamam a atenção para o fato de pacientes portadores de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à Rifampicina terem grande chance de serem resistentes a outros tuberculostáticos (CARVALHO et al., 2007). Esse fármaco inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas e de muitos microrganismos Gram-negativos, sendo bactericida para microrganismos tanto intracelulares, quanto extracelulares. Além do efeito bactericida sobre as bactérias metabolicamente ativas, o fármaco também possui uma ação esterilizante excelente frente às bactérias em estado de latência (BRUNTON et al., 2006).

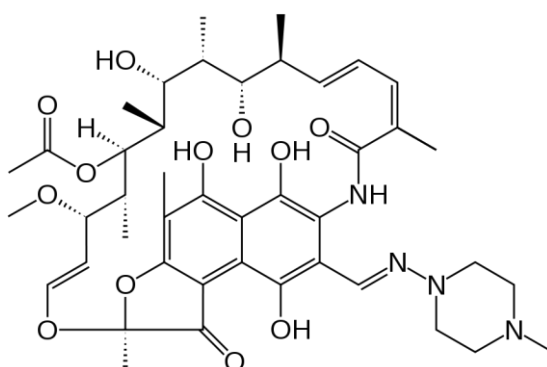


Figura 8 – Estrutura química da Rifampicina.

Fonte: Estrutura química desenhada com auxílio do programa ChemWindow 6.0 (Bio-Rad Laboratories).

O mecanismo de ação da Rifampicina (Figura 8) é inibir a síntese de RNA ao se ligar a subunidade β da RNA polimerase, a Rifampicina bloqueia a fase inicial da transcrição (CHOPRA, BRENNAN, 1998, KOZOLOV et al., 2013). A resistência à Rifampicina é ocasionada por mutações, numa região bem definida de 81 pares de bases (pb), do gene *rpoB* que codifica a cadeia β da RNA polimerase. Mutações nas posições 531, 526 e 516 estão entre as mutações mais frequentes em linhagens resistentes a Rifampicina. (MOKROUSOV et al., 2003).

Quadro 1- Mecanismo de ação dos fármacos e os genes associados na resistência a *M. tuberculosis*

FÁRMACO	MECANISMO DE AÇÃO	GENE ENVOLVIDO	FUNÇÃO
ISONIAZIDA	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos	<i>katG</i> <i>inhA</i>	Conversão da pró-droga Alvo fármaco
RIFAMPICINA	Inibição da transcrição	<i>rpoB</i>	Alvo fármaco

Fonte: Adaptado de Rossetti et al. (2002).

2.7. MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA

O desenvolvimento de novas metodologias que permitam um rápido diagnóstico de TB resistente é muito importante para se obter o controle e redução na disseminação da doença. Atualmente, o estudo de mecanismos moleculares que objetivam a detecção rápida de bactérias sensíveis aos fármacos tem sido testado. Dentre essas tecnologias, muitas se baseiam em técnicas moleculares que empregam a PCR que consiste na amplificação “in vitro” de sequências específicas de DNA sintetizadas enzimaticamente. Pesquisadores têm desenvolvido métodos com diferentes protocolos e modelos desta reação, dentre eles destacam-se:

2.7.1. INNO-LIPA Rif TB

O kit comercial é composto por 10 sondas cujo princípio é a amplificação (PCR) de um segmento do gene *rpoB* (o qual codifica uma região alvo da resistência à RIF). Método colorimétrico que se baseia na hibridização reversa do produto amplificado do genoma da micobactéria com sondas específicas de uma região de 157 pb do gene *rpoB* que posteriormente é desnaturado e hibridizado nessas fitas para ser ou não reconhecida a presença de mutação (TORTOLI & MARCELLI, 2007). Este ensaio apresenta a vantagem de ser realizado em isolados a partir de cultura ou de espécimes clínicos e o tempo de duração é em média de 48 horas, porém, apresenta a desvantagem de ter um custo elevado (SOINI, 2001; ROSSAU et al., 1997).

2.7.2. GenoType MTBDRplus

Também disponível comercialmente, possui um princípio semelhante ao INNO-LIPA, o qual detecta simultaneamente mutações que conferem resistência à RIF e INH, englobando os principais sítios de mutação dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* em amostras de isolados de cultivos e também, diretamente em amostras de escarros positivos (HILLEMANN et al., 2007; ANEK-VORAPONG et al., 2010). Permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à Rifampicina e/ou Isoniazida, a partir de amostras cultivadas ou diretamente de material pulmonar do paciente (SOMOSKOVI et al., 2006).

2.7.3. Gene Xpert™ MTB/Rif

O teste Xpert® MTB/RIF é um teste de amplificação de ácidos nucleicos utilizado para detecção de *M. tuberculosis* e para a triagem de cepas resistentes a Rifampicina no momento. O teste consiste na purificação, concentração e amplificação de ácidos nucleicos por PCR em tempo real e na identificação de sequências de ácidos nucleicos no genoma do *M. tuberculosis*, especificamente do gene *rpoβ* (HELB et al., 2010). A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucleicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma do dispositivo de teste, o teste Xpert® MTB/RIF integra e automatiza os três processos: preparação de amostras, amplificação e detecção, necessários para a PCR em tempo real baseada em testes moleculares. O teste Xpert® MTB/RIF utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. O teste pode fornecer resultados em menos de 2 horas, sem necessitar de tratamento da amostra ou de recursos humanos especializados em biologia molecular (BRASIL, 2008; LAWN et al., 2011; BOEHME et al., 2010).

Apesar da agilidade do teste em fornecer o resultado e, dessa maneira, minimizar o custo para o paciente em relação ao gasto de tempo e com transporte e alimentação durante o diagnóstico da TB nos serviços de saúde, o equipamento é de alto custo e a aquisição dos insumos é restrita as empresas que comercializam os devidos kits.

Portanto, há várias técnicas de PCR disponíveis que podem ser padronizadas, otimizadas e vir a ser aplicadas nos sistemas públicos de saúde, e assim contribuir para uma rápida detecção de mutações associadas às resistências aos fármacos antituberculosos fornecendo ao paciente um tratamento mais adequado à doença.

2.7.4. Sequenciamento de DNA

Baseia-se na técnica de PCR onde analisa os nucleotídeos de uma região escolhida específica do genoma. Permite avaliar as mutações, ao detectar tanto as mutações conhecidas como as não conhecidas, através de análise e comparação de uma linhagem selvagem com uma resistente que pode estar relacionada a um determinado fármaco. É um método sensível e eficaz, sendo considerado padrão ouro no diagnóstico molecular. (SOINI & MUSSER, 2001).

2.7.5 DNA – Microarray

Baseia-se na análise de regiões que sofreram mutações através de um padrão estabelecido por hibridização com um chip de oligonucleotídeos. É um sistema composto de uma matriz com várias sondas de DNA fixadas onde, serão hibridizadas e seus resultados registrados e interpretados usando programas de computador. Método rápido, porém, com elevado custo (KIVI et al., 2002; SHIMIZU et al., 2008).

2.7.6 PCR em Tempo Real (qPCR)

A PCR em tempo real é assim denominada por permitir monitorar o progresso da amplificação do DNA-alvo em tempo real durante a fase exponencial da curva de amplificação, empregando a tecnologia de fluorescência. Esta metodologia utiliza sondas fluorescentes acrescidas aos iniciadores, que reconhecem sequências específicas no DNA-alvo e emitem um sinal fluorescente correspondente ao ciclo de amplificação

no qual o DNA-alvo é replicado (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004; VALASEK & REPA, 2005).

Para que haja emissão da fluorescência, a molécula fluorescente ou fluoróforo absorve a energia de uma fonte de luz e processa essa energia internamente excitando suas moléculas, liberando-a em forma de luz num determinado comprimento de onda. Este comprimento de onda é então captado por um dispositivo de carga acoplada ou câmera CCD (chargecoupled device), analisado por um software e registrado em forma de curvas de amplificação e de fluorescência, sendo convertido na forma de Cycle Threshold (CT). Este CT representa o número exato do ciclo no qual foi sinalizada a amplificação do DNA acima de um limiar previamente estabelecido (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004; VALASEK & REPA, 2005).

Durante a amplificação, a emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, a rapidez com que o sinal fluorescente atinge o CT correlaciona-se com a quantidade da sequência-alvo, permitindo assim a quantificação do DNA presente originalmente na amostra antes da amplificação (VALASEK & REPA, 2005).

O produto final da PCR pode ainda ser caracterizado de acordo com a temperatura de melting, ou seja, a temperatura na qual a dupla-fita deste produto se separa. Este ponto de melting é uma propriedade exclusiva dependente do tamanho do produto e da sua composição nucleotídica. Sua determinação é particularmente necessária quando se utilizam moléculas fluorescentes que se intercalam em qualquer sequência de DNA dupla-fita, assegurando que o produto amplificado seja o de interesse (VALASEK & REPA, 2005).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVO

3.1. Geral

- Avaliar o desempenho da PCR em Tempo Real na detecção de genes em *Mycobacterium tuberculosis*, associados à resistência à Isoniazida e à Rifampicina, em amostras de escarros de pacientes multibacilares com TB pulmonar.

3.2. Específicos

3.2.1 Determinar a frequência de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Isoniazida e à Rifampicina em casos novos de TB pulmonar, em pacientes residentes em Manaus-AM;

3.2.2 Avaliar se o teste de PCR em Tempo Real executado diretamente nas amostras de escarros proporciona acuidade comparável ao método de redução de nitrato (antibiograma-teste fenotípico) para determinação da resistência aos fármacos Isoniazida e Rifampicina;

3.2.3 Verificar a concordância da PCR em Tempo Real a partir de amostras de escarros e de isolados de cultivo de *M. tuberculosis*, para detecção de genes associados à resistência a Isoniazida e Rifampicina.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo de estudo

Estudo tipo observacional que visou à utilização da técnica molecular PCR em Tempo Real para a detecção rápida de mutações genéticas associadas à resistência aos fármacos antimicrobianos a partir de escarros de pacientes com Tuberculose Pulmonar.

4.2. Aspectos Éticos e de Financiamento

O presente estudo teve o apoio da FAPEAM (via projeto PPSUS, aprovado), coordenado pelo pesquisador do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA), Doutor Mauricio Morishi Ogusku e co-orientador deste trabalho. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do INPA com o número de protocolo 221-09 e está vinculado ao projeto “Investigação de Tuberculose pulmonar por múltiplas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Infecção Policlonal) e sua possível associação com a resistência às drogas antimicrobiana) do Programada Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde.

4.3. Universo do Estudo

4.3.1. Participantes e Critérios de Elegibilidade

Os pacientes recrutados residem em Manaus-AM e foram atendidos na Policlínica Cardoso Fontes, a qual é referência estadual em Tuberculose. A população foi composta por pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar com baciloscopia positiva ou

negativa, mas com o cultivo positivo para *M. tuberculosis*, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 60 anos, sem tratamento anterior ou com recidiva e os que abandonaram o tratamento. A aceitação destes pacientes para participarem deste estudo foi feita mediante a concordância em um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que esclarecia sobre o referido estudo.

Para o cálculo do número de pacientes foi utilizado o módulo EpiTable (tamanho de amostra, proporção simples) do software EpiInfoTM, versão 6.04d (DEAN et al., 1998). Para pacientes multibacilares, o número calculado foi de 56, considerando:

- a) Número de casos de TB pulmonar multibacilar na cidade de Manaus (SEMSA, 2012): 863;
- b) Precisão: 3%;
- c) Prevalência esperada de Tuberculose resistente: 1,4% (BRASIL, 2009b);
- d) Intervalo de confiança: 95%.

4.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com cultivo do escarro negativo para *M. tuberculosis*, positivos para outras espécies de micobactérias ou pacientes com cultivos contaminados por outros microrganismos.

4.3.3. Organização do Experimento

O fluxograma dos procedimentos que foram realizados encontra-se na figura 9.

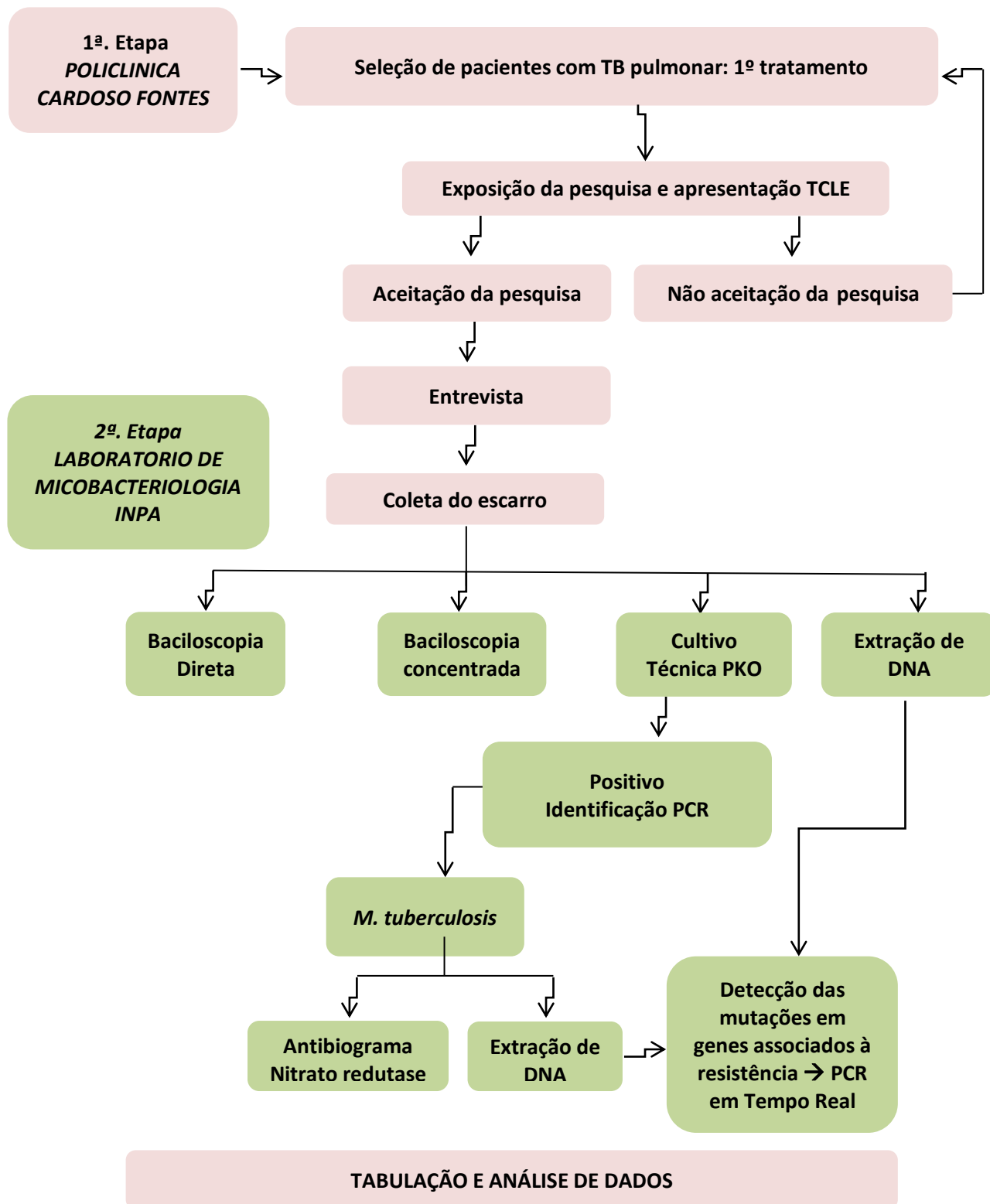


Figura 9 – Fluxograma das atividades.

4.4. Procedimentos Micobacteriológicos

A partir da amostra de escarro foram realizadas a baciloscopia direta e baciloscopia pós concentração e, na sequência, o cultivo pela técnica de PKO. As técnicas foram realizadas de acordo com Salem et al. (1990) e Salem et al. (2007). Após o processamento para o cultivo, as alíquotas de escarro foram armazenadas a -20°C até a extração do DNA.

4.5. Identificação de *M. tuberculosis* por PCR

As micobactérias que se desenvolveram nos cultivos foram identificadas como *M. tuberculosis* por PCR com oligonucleotídeos específicos para o complexo *M. tuberculosis*. Neste ensaio, um fragmento de 245 pares de bases (pb) da sequência de inserção IS6110 foi amplificado por PCR com oligonucleotídeos INS-1 (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3') e INS-2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'), conforme Hermans et al (1990) e Van Embden et al. (1993). Os parâmetros de amplificação estão descritos na tabela a seguir:

Quadro 2 - Parâmetros de amplificação para a PCR IS6110.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos – segundos)	Ciclo (s)
94	4-00	1
94	1-00	5
66	1-00	
72	1-00	
72	5-00	1
4	∞	1

Os produtos da PCR foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Green, em transiluminador de luz azul.

4.6. Teste de Sensibilidade aos Fármacos

O teste de sensibilidade aos fármacos à INH e RIF foi determinado pelo Método de Redução de Nitrato Redutase em meio de Lowenstein-Jensen com NaNO_3 (Nitrato de Sódio). O método da Redução de Nitrato foi realizado de acordo com a técnica estabelecida por Angeby et al. (2002), com adaptação de Martins, que usou KNO_3 (Nitrato de Potássio) como fonte de nitrato incorporado ao meio de Löwenstein-Jensen. A leitura e a interpretação do método da Redução de Nitrato foram baseadas na mudança de coloração do meio de cultivo de verde para rosa, indicando, portanto, a redução de nitrato a nitrito, devido ao desenvolvimento de *M. tuberculosis* e produção da enzima nitrato redutase. Cada amostra teve um tubo controle (sem o fármaco de interesse) e um tubo contendo o fármaco. A leitura para a confirmação de resistência foi comparada ao tubo controle. Desta forma, foi considerada como cepa resistente ao fármaco testado, aquela em que o meio de cultivo (contendo o fármaco) apresentou uma coloração mais forte que a do tubo controle testado, ou seja, rosa forte, vermelho intenso ou violeta. Para os tubos que não apresentaram mudança de coloração foi considerado indicativo de sensibilidade ao fármaco testado.

4.7. Técnicas Moleculares para Determinação dos Genes de Resistência

4.7.1. Extração de DNA a partir da amostra do cultivo bacteriano

A extração foi realizada de acordo com o protocolo de Leão et al (2004). Uma pequena porção de colônia da micobactéria foi colhida com um alça bacteriológica estéril descartável e ressuspensa em 1mL de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH-8,0) e depois inativada por 60 minutos a 95°, de acordo com Ogusku (2012). Logo após a inativação, a suspensão foi centrifugada a 1200 x g por 10 minutos e o sedimento ressuspensa em 200 µL de tampão TET (10 mM Tris-HCl, pH-7,4, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100). Esta nova suspensão foi incubada a 100°C por 10 min e posteriormente armazenada a -20°C por 24 horas. Em seguida, a mesma foi centrifugada a 12000 x g por 30 segundos. Dessa suspensão, 5 µL do sobrenadante foi utilizado para a amplificação de DNA.

4.7.2. Extração de DNA a partir da amostra de escarro

As amostras de escarro tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo de Ogusku et al. (2003). Uma alíquota de 200 µL de escarro processado pela técnica de PKO e armazenada a -20°C foi descongelada a temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,1 mM EDTA). Após este procedimento, a centrifugação foi repetida e o sobrenadante descartado. Ao sedimento foi adicionado um volume de 250 µL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH8, 0,5 mM EDTA, 1% Tween 20, 1% Triton X-100, 800 µg/mL de Proteinase

K). A solução foi homogeneizada em vórtex e posteriormente incubada a 56°C por um período. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos e imediatamente acondicionada em banho de gelo por 2 minutos. Logo após foi submetida sucessivamente por 2 vezes, por períodos intercalados de 2 minutos a 100°C e 2 minutos em banho de gelo. A purificação do DNA foi realizada conforme Ogusku et al. (2003) e Pierre et al. (1991).

4.7.3. PCR em Tempo Real (qPCR)

Todos os isolados de *M. tuberculosis* foram testados para *katG*, *rpoB* e *inhA* usando ensaios de qPCR de um único alvo. A sensibilidade e a especificidade dos ensaios de qPCR foram calculadas a partir da comparação com os resultados do teste fenotípico de resistência como o padrão-ouro. Para testar a resistência à Isoniazida, dois conjuntos de iniciadores e sondas foram utilizados para hibridizar com dois alvos diferentes (Tabela 3). Uma sonda molecular complementar aos códons 313-318 do gene *katG* e a outra complementar ao local de ligação ribossomal no gene *inhA* foram utilizadas. Para testar a resistência à rifampicina, um conjunto de iniciadores e três sondas (SW89, SW112 e SW182) foram utilizados para hibridizar com um único fragmento amplificado do gene *rpoB* de tal modo que as sequências das sondas cobriram toda a região central, com sobreposição de sequências de um a três nucleotídeos de acordo com Gonçalves et al. (2012).

QUADRO 3 – Primers e sondas para amplificação do gene, sequenciamento e PCR em Tempo Real.

<i>Gene alvo</i>	Primers e sondas	Nome	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	Concentração Final (µM)
<i>katG</i>	Primers qPCR	katGf3 katGr3	CGTCGGCGGTCACACTTTCGGTAAGA TTGTCCCATTTTCGTCGGGGTGTTCGT	50 50	0,6 0,6
	Sondas qPCR	katGpb	FAM-CCGAGGCACCAGCGGCATCGACCTCGG-BHQ1	50	0,6
<i>inhA</i>	Primers qPCR	inhAf inhAr	GTGGACATACCGATTTTCG CTCCGGTAACCAGGACTGAACGGG	55 55	0,3 0,3
	Sondas qPCR	inhPb	FAM-CGAGGCCGACAACCTATCGTCTCCTCG-BHQ1	55	0,1
<i>rpoB</i>	Primers qPCR	rpoBf2 rpoBr2	GGCCGGTGGTCGCCGCG ACGTGACAGACCGCCGGGC	60 60	0,4 e 0,6 0,4 e 0,6
	Sondas qPCR	SW112	FAM-CCACGCTTGTGGGTCAACCCCGTGG	50	0,3

Fonte: Adaptado de Gonçalves et al. (2012).

As sondas para qPCR foram desenhadas a fim de hibridizarem as sequências que não continham mutações associadas à resistência aos antibióticos. A resistência aos fármacos foi indicada pela ausência de um sinal característico de fluorescência crescente durante a PCR. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e em poços selados em uma placa de microtitulação de 96 poços (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termociclador StepOne (Applied Biosystems). Cada mistura de reação conteve 5,0 µL de suspensão lisada e diluída 1/10 em água, 0,3 µL de cada iniciador, 0,3 µL de sonda e 5,0 µL de TaqMan Master mix 2X (Applied Biosystems). Água ultrapura foi adicionada para alcançar o volume de reação de 25 µL. As reações foram incubadas durante 2 minutos a 50°C e 10 min a 95°C e, em seguida, por 50 ciclos de 30s a 95°C, 1 min de anelamento a 50°C (55°C para a reação *inhA*) e 30s a 60°C.

Todas as reações para a Rifampicina foram inicialmente realizadas como um ensaio de qPCR de um alvo único com um conjunto de iniciadores e uma sonda marcada com FAM por tubo de reação para todos isolados.

Valores de C_T entre 18-39 foram considerados positivos, o que significa que nenhuma mutação estará presente no fragmento do gene a ser testado, por conseguinte, indicando suscetibilidade. Valores de C_T igual a zero ou superior a 40 foram considerados negativos, indicando a presença de uma mutação associada à resistência a drogas.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação dos resultados obtidos pelo Método de Redução de Nitrato e pelo Método Molecular foi utilizado o teste de Concordância *kappa*. E para análise de associação, entre as mutações dos genes *katG*, *inhA* para resistência à Isoniazida e ao gene *rpoB* para verificação da resistência à Rifampicina, foi utilizada o teste do qui quadrado (χ^2) com correção de Yates e/ou o Exato de Fisher, de acordo com a natureza dos dados. Os programas utilizados para as análises foram o BioEstat 5.0 e o GraphPad Prism 6.0. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 5\%$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Para esse estudo, 226 amostras de escarro foram obtidas de pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar. Dessas amostras, foi possível isolar por cultivo 171 isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, das quais foram oriundas de pacientes de Tb pulmonar multibacilar. Das amostras excluídas, 52 foram negativas no cultivo, 1 teve cultivo contaminado por outros microorganismos e 2 foram positivos para micobactérias não causadoras de TB (MNT).

5.1 Características dos pacientes de TB pulmonar inclusos no estudo.

As características gerais dos 171 pacientes de TB pulmonar, dos quais as amostras foram avaliadas, estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Características gerais dos pacientes de Tuberculose (TB) pulmonar, com diagnóstico laboratorial positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.

Características dos pacientes (n=171)	
Idade (anos) (média e desvio padrão)	36±12
Tabagismo (%)	
Sim	68,89
Não	30,22
Sem informação	0,89
Vacina BCG (%)	
Sim	25,78
Não	68,44
Sem informação	5,78
Gênero (%)	
Masculino	69,78
Feminino	30,22
Naturalidade (%)	
Manaus	64,73
Outros municípios	35,27

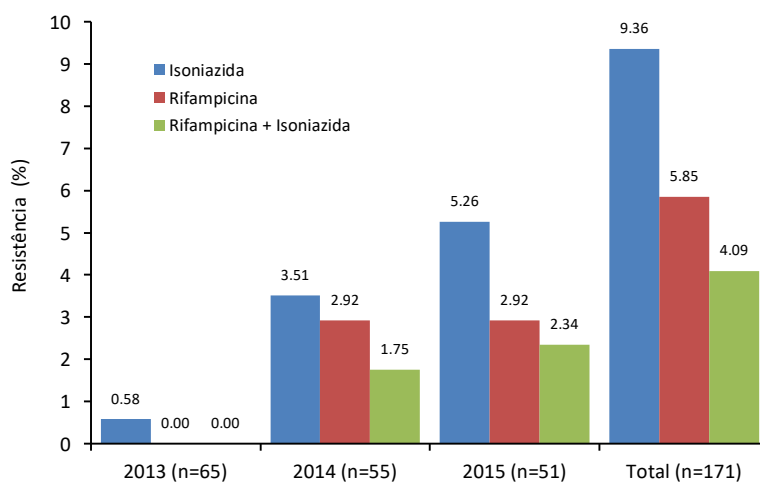
FONTE: Elaborado pela autora

5.2 Resultado da frequência da sensibilidade e resistência aos fármacos Isoniazida e Rifampicina

As amostras de escarro obtidas para este estudo foram do período de 2013 a 2015, totalizando 171 amostras válidas, distribuídas da seguinte forma: 65 amostras de 2013, 55 amostras de 2014 e 51 amostras de 2015.

Dos 171 isolados de *M. tuberculosis* submetidos aos testes de sensibilidade pelo Método da Redução de Nitrato, teste padrão no presente estudo, oriundos das amostras de pacientes com TB pulmonar (casos novos), a maior frequência de resistência foi observada para Isoniazida com 9,36%. A distribuição do percentual de resistência a Isoniazida e Rifampicina pode ser observada na Figura 10.

Figura10 - Frequência da Resistência à Isoniazida e à Rifampicina, em isolados de *M. tuberculosis*, a partir de amostras de escarro, de pacientes com TB pulmonar.



5.3 Análise de Associação dos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* para resistência aos fármacos anti-TB.

A partir da extração de DNA de 171 amostras de escarro e de isolados de cultivo foram realizados os teste de qPCR para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB*, descritos por vários autores como genes associados a resistência aos principais fármacos

utilizados no tratamento da TB pulmonar. Para esta análise o teste de Nitrato Redutase foi considerado, no presente estudo, como o padrão para a comparação com os demais testes. Os resultados das análises estão descritos a seguir:

No teste de qPCR, a partir de amostras de escarro, para *katG* foi observado que este gene apresentou associação a resistência a Isoniazida ($p=0,0001$; IC95% = 3,61 a 21,01) (Tabela 3), enquanto o gene *inhA* não apresentou associação a Isoniazida ($p=0,4870$) (Tabela 4).

Tabela 3: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *katG*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR-Escarro - <i>katG</i>			
Presença de mutação (+)	9 (5,26%)	13(7,60%)	22(12,87%)
Ausência de mutação (-)	7 (4,09%)	142(83,04%)	149(87,13%)
Total	16	155	171(100,00%)

INH – Isoniazida: Análise de associação - teste χ^2 $p=0,0001$; IC95% (3,61 a 21,01)
Índice $kappa=0,4097$; Replicabilidade=Boa; CE=0,883; CO=0,802; $p=0,0001$

Tabela 4: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *inhA*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR-Escarro – <i>inhA</i>			
Presença de mutação (+)	4 (2,34%)	26 (15,20%)	30(17,54%)
Ausência de mutação (-)	12(15,20%)	129(67,25%)	141(82,46%)
Total	16(17,54%)	155(82,46%)	171(100,00)

INH – Isoniazida: TesteT Exato de Fisher $p=0,4870$
Índice $kappa=0,0591$; Replicabilidade=Fraca; ; CE=0,7778; CO=0,7638; $p=0,2051$.

5.3.1 Análise de Associação do gene *katG* e *inhA* para resistência a Isoniazida:

Em relação aos resultados observados pelo teste de qPCR, a partir de amostras de cepas de *M. tuberculosis* isolados por cultivo, o gene *katG* também apresentou associação a resistência a Isoniazida ($p=0,0011$; IC95% = 2,26 a 13,50) (Tabela 6) e o gene *inhA* não apresentou associação ($p=1,000$) (Tabela 7).

Tabela 6: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *katG*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR- Cultivo – <i>katG</i>			
Presença de mutação (+)	5(2,92%)	8(4,68%)	13(7,60%)
Ausência de mutação (-)	11(6,43%)	147(85,96%)	158(92,40%)
Total	16(9,36%)	155(90,64%)	171(100,00%)

INH – Isoniazida: Análise de associação - teste χ^2 $p=0,0011$ IC95% (2,26 a 13,50)
Índice kappa=0,2848; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8889; CO=0,8446; $p=0,0001$

Tabela 7: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *inhA*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR- Cultivo – <i>inhA</i>			
Presença de mutação (+)	0(0,00%)	5(2,92%)	5(2,92%)
Ausência de mutação (-)	16(9,36%)	150(87,72%)	166(97,08%)
Total	16(9,36)	155(90,64%)	171(100,00)

INH – Isoniazida: TesteT Exato de Fisher $p=1,000$
Análise de concordância: Índice kappa= -0,0466; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8772; CO=0,8827,
 $p=0,233$

5.3.2 Análise de Associação do gene *rpoB* para resistência a Rifampicina:

Na análise de associação para resistência a Rifampicina houve associação com gene *rpoB* ($p = 0,0001$; IC95%= 6,35 a 51,05) (Tabela 5), para o teste qPCR de amostras de escarro. No entanto para o teste de qPCR de amostras de cepas de *M.*

tuberculosis isolados de cultivo não houve associação do gene *rpoB* com resistência a Rifampicina (Tabela 8).

Tabela 5: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *rpoB*

Rifampicina qPCR-Escarro – <i>rpoB</i>	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	5 (2,92%)	4 (2,34%)	9 (5,26%)
Ausência de mutação (-)	5 (2,92%)	157 (91,81%)	162(94,74%)
Total	10 (5,85%)	161 (94,15%)	171(100,00)

RIF – Rifampicina: TesteT Exato de Fisher $p=0,0001$; IC95% (6,347 a 51,05)
Índice $kappa=0,4985$; Replicabilidade=Boa; CE=0,9474; CO=0,895; $p=0,0001$

Tabela 8: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *rpoB*

Rifampicina qPCR- Cultivo – <i>rpoB</i>	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	0(0,00%)	2(1,17%)	2(1,17%)
Ausência de mutação (-)	10(5,85%)	159(92,98%)	169(98,83%)
Total	10(5,85%)	161(94,15%)	171(100,00%)

RIF –Rifampicina: Análise de concordância: Índice $kappa=-0,0199$; Replicabilidade=Fraca;
CE=0,9298; CO=0,9312, $p=0,3615$

5.4 Análise de concordância entre a PCR em Tempo Real (qPCR), de amostra de escarro e isolados de cultivo, e o Método de Redução de Nitrato (MRN).

Para análise de concordância entre os testes qPCR e o método padrão MRN, dois tipos de amostras foram utilizadas para os testes moleculares, um a partir de amostras de escarro e outro de isolados de cultivo, conforme resultados a seguir:

5.4.1 Análise de concordância entre a qPCR de amostras de escarro (qPCR-E) e MRN

Das 171 amostras de escarro testadas para a qPCR, 22 foram positivas para a presença de mutação no gene *katG*, e destas 9 amostras foram concordantes com os resultados para MRN, em relação a resistência a Isoniazida (Índice $kappa=0,4097$) (Tabela 3). Como esperado, o resultado para o gene *inhA* foi inferior, apresentando uma fraca concordância com o método MRN (Índice $kappa=0,0591$) (Tabela 4), já que a mutação no gene *katG* é a que está mais frequentemente associada aos casos de resistência à Isoniazida.

Tabela 3: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *katG*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR-Escarro - <i>katG</i>			
Presença de mutação (+)	9 (5,26%)	13(7,60%)	22(12,87%)
Ausência de mutação (-)	7 (4,09%)	142(83,04%)	149(87,13%)
Total	16	155	171(100,00%)

INH- Isoniazida: Análise de associação - teste $\chi^2 p=0,0001$; IC95% (3,609 a 21,01)
Índice $kappa=0,4097$; Replicabilidade=Boa; CE=0,883; CO=0,802; $p=0,0001$

Tabela 4: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *inhA*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR-Escarro - <i>inhA</i>			
Presença de mutação (+)	4 (2,34%)	26 (15,20%)	30(17,54%)
Ausência de mutação (-)	12(15,20%)	129(67,25%)	141(82,46%)
Total	16(17,54%)	155(82,46%)	171(100,00)

INH – Isoniazida: TesteT Exato de Fisher $p=0,4870$
Índice $kappa=0,0591$; Replicabilidade=Fraca; ; CE=0,7778; CO=0,7638; $p=0,2051$.

Para análise de resistência a Rifampicina houve relativamente uma boa concordância entre os resultados para o gene *rpoB* e MRN (Índice $kappa=0,4985$) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do escarro), para mutações dos genes *rpoB*

Rifampicina qPCR-Escarro – <i>rpoB</i>	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	5 (2,92%)	4 (2,34%)	9 (5,26%)
Ausência de mutação (-)	5 (2,92%)	157 (91,81%)	162(94,74%)
Total	10 (5,85%)	161 (94,15%)	171(100,00)

RIF – Rifampicina: TesteT Exato de Fisher $p=0,0001$; IC95% (6,347 a 51,05)
Índice $kappa=0,4985$; Replicabilidade=Boa; CE=0,9474; CO=0,895; $p=0,0001$

5.4.2 Análise de concordância entre a qPCR de isolados de cultivo (qPCR-C) e MRN.

Os resultados dos testes realizados por qPCR de isolados de cultivo de *M. tuberculosis*, para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB* apresentaram baixa concordância (Tabelas 6, 7 e 8) em relação aos resultados de resistência observadas no MRN, método padrão para este estudo.

Tabela 6: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *katG*

Isoniazida qPCR- Cultivo – <i>katG</i>	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	5(2,92%)	8(4,68%)	13(7,60%)
Ausência de mutação (-)	11(6,43%)	147(85,96%)	158(92,40%)
Total	16(9,36%)	155(90,64%)	171(100,00%)

INH – Isoniazida: Análise de associação - teste $\chi^2 p=0,0011$
Índice $kappa=0,2848$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8889; CO=0,8446; $p=0,0001$

Tabela 7: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Isoniazida pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *inhA*

Isoniazida	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR- Cultivo – <i>inhA</i>			
Presença de mutação (+)	0(0,00%)	5(2,92%)	5(2,92%)
Ausência de mutação (-)	16(9,36%)	150(87,72%)	166(97,08%)
Total	16(9,36)	155(90,64%)	171(100,00)

INH – Isoniazida: TesteT Exato de Fisher $p=1,0000$

Índice $kappa=-0,0466$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8772; CO=0,8827, $p=0,233$

Tabela 8: Distribuição dos resultados do teste de sensibilidade à Rifampicina pelo MRN e do qPCR (a partir do cultivo), para mutações dos genes *rpoB*

Rifampicina	Nitrato Redutase		Total
	Resistente	Sensível	
qPCR- Cultivo – <i>rpoB</i>			
Presença de mutação (+)	0(0,00%)	2(1,17%)	2(1,17%)
Ausência de mutação (-)	10(5,85%)	159(92,98%)	169(98,83%)
Total	10(5,85%)	161(94,15%)	171(100,00%)

RIF – Rifampicina: Índice $kappa=-0,0199$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,9298; CO=0,9312, $p=0,3615$

A comparação dos resultados obtidos (Tabela 08) evidenciou uma fraca associação entre a qPCR-Cepa-*rpoB* e o MNR. Revelando assim que não foi detectada a mutação no códon 526 nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à Rifampicina.

5.4.3 Análise de concordância entre os testes de qPCR-E e qPCR-C

Os resultados dos ensaios moleculares a partir de amostras de escarro (qPCR-E) e isolados de cultivo (qPCR-C) para os genes *katG* (Índice $kappa = 0,2102$) e *inhA*, descritos como associados a resistência à Isoniazida, apresentaram fraca concordância conforme resultados descritos nas Tabelas 9 e 10. Resultados semelhantes foram observados para o gene *rpoB*, descrito como associado a resistência à Rifampicina, conforme resultados constantes na Tabela 11.

Tabela 9: Distribuição dos resultados qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para o gene *katG*

Isoniazida	qPCR-Escarro-<i>katG</i>		Total
qPCR- Cultivo -<i>katG</i>	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	5(1,75%)	8(5,85%)	13(7,6%)
Ausência de mutação (-)	17(3,51%)	141(88,89%)	158(92,40%)
Total	22(5,26%)	149(94,74%)	171(100,00%)

INH – Isoniazida: Índice $kappa=0,2102$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8149; CO=0,8538; $p=0,0021$.

Tabela 10: Distribuição dos resultados do teste qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para o gene *inhA*

Isoniazida	qPCR-Escarro-<i>inhA</i>		Total
qPCR- Cultivo - <i>inhA</i>	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	2(1,17%)	3(1,75%)	5(7,60%)
Ausência de mutação (-)	28(16,37%)	138(80,70%)	166(92,40%)
Total	30(5,26%)	141(94,74%)	171(100,00)

INH – Isoniazida: Índice $kappa=0,0675$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,8187; CO=0,8056; $p=0,0901$.

Tabela 11: Distribuição dos resultados pelo qPCR-Cultivo e do qPCR-Escarro, para mutações o gene *rpoB*

Rifampicina	qPCR-Escarro-<i>rpoB</i>		Total
qPCR- Cultivo - <i>rpoB</i>	Resistente	Sensível	
Presença de mutação (+)	0(0,00%)	2(1,17%)	2(1,17%)
Ausência de mutação (-)	9(5,26%)	160(93,57%)	169(98,83%)
Total	9(17,54%)	162(94,74%)	171(100,00)

RIF – Rifampicina: Índice $kappa=-0,0195$; Replicabilidade=Fraca; CE=0,9357; CO=0,9369; $p=0,3687$.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão dos resultados

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que 1/3 da população do mundo tem contato com o bacilo da TB. A doença atinge 9 milhões de pessoas a cada ano, e causa a morte de cerca de 1,5 milhões no mesmo período. O Brasil se encontra entre os 22 países do mundo com percentual elevado de casos novos da TB (WHO, 2015). Os estados do Amazonas e Rio de Janeiro apresentam as maiores taxas de incidência da TB no país, fatos que encorajam a inclusão de testes de diagnóstico confiáveis, e que possam fornecer resultados mais rápidos e, desta forma, instituir tratamento adequados para o controle da TB e reduzir os casos da doença.

Dos 171 pacientes de TB, que tiveram suas amostras coletadas para os ensaios laboratoriais, a média de idade foi de 36 anos, ou seja, em uma fase produtiva e quase 70% foram do sexo masculino, corroborando com os dados observados em outros estudos (PRADO et al., 2008; SOUZA et al., 2014). Além disso, 68,9% dos pacientes eram tabagistas, comportamento considerado um fator de risco para o desenvolvimento da TB e outras doenças pulmonares (PRADO et al., 2008; SOUZA et al., 2014). Apenas 20,78% dos pacientes receberam a BCG, no entanto é de conhecimento que a BCG em adultos pode ter eficácia muito variável, de 0 a 80%, dependendo da população investigada (COLDITZ et al., 1994; BREWER et al., 2000). A maioria dos pacientes de TB foi oriunda da cidade de Manaus, mas este resultado já era o esperado, considerando que a capital apresenta a maior taxa de incidência do Amazonas (BRASIL, 2016).

Embora o foco do estudo não tenha sido epidemiológico, os resultados obtidos neste estudo no período de 2013 a 2015 para o teste de sensibilidade, aos principais fármacos anti-TB, mostrou total de 4,09% de TB-MR, ou seja, resistência combinada a Isoniazida e a Rifampicina em casos de primeira vez ao tratamento para TB. Na análise dos dados por ano,

foi observada a maior frequência em 2015 com 2,3 % de TB-MR (Figura 11). Estes resultados foram comparáveis aos observados em 2012 por Garrido et al, (2014), que encontrou 1,7% de TB-MR na cidade de Manaus. Dados semelhantes foram observados no estudo de resistência realizado na cidade de Porto Alegre no período de 2006 a 2007, com 2,2% de TB-MR (MICHELETTI et al., 2014). Embora os três períodos investigados de TB-MR sejam diferentes, demonstram que houve um aumento considerável no número de casos novos de TB-MR, quando comparados aos dados do 1º. Inquérito Nacional realizado em 1996 que observou 1,1% de TB-MR (BRAGA; WERNECK BARRETO; HIJJAR, 2003).

Em relação à monoresistência, foi observada uma frequência total de 9,36% para Isoniazida e 5,85% para Rifampicina, mas os resultados referentes ao ano de 2015 foram de 5,26% e 2,92% respectivamente. Neste estudo a monoresistência para Isoniazida foi superior a Rifampicina, fato também observado nos dados de 2012 na cidade de Manaus, por Garrido et al., (2014) e na cidade de Porto Alegre, no período de 2006 a 2007, publicados por Micheletti et al., (2014). A monoresistência a Isoniazida deve receber atenção especial, pois é um dos principais fármacos no tratamento da TB, bem como o fármaco de escolha para a quimioprofilaxia (BRASIL, 2011).

Conforme os dados citados anteriormente, o percentual de isolados resistentes, oriundos de amostras de pacientes casos novos de MR-TB informa que a frequência de bacilos resistentes é um fato notório, crescente que necessita de controle de tratamento mais efetivo. Esta situação é preocupante, pois a transmissão de *M. tuberculosis* resistente prejudica o controle da TB.

O diagnóstico precoce e tratamento adequado é a base das campanhas mundiais de controle da TB (WHO, 2013). Buscando evitar a transmissão contínua da doença e erros no diagnóstico, neste aspecto são necessários testes laboratoriais mais acurados e rápidos,

principalmente em regiões com elevado número de casos da doença, como o estado do Amazonas.

No presente trabalho, a proposta principal foi avaliar o desempenho do teste da qPCR, a partir de amostras de escarro, na tentativa de obter resultados mais rápidos para sensibilidade aos fármacos antituberculose, sem a necessidade de realizar a etapa do cultivo para os testes convencionais.

No entanto, ao avaliar os resultados dos ensaios moleculares, a qPCR em amostras de escarro, para detectar a presença ou ausência de mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* de *M. tuberculosis*, associados a resistência aos principais fármacos antituberculose, observou-se que o resultado foi satisfatório para o gene *katG* associado a resistência a Isoniazida e gene *rpoB* a resistência a Rifampicina (Tabelas 3 e 5), dados semelhantes aos publicados em diversos artigos sobre genes associados a resistência (PERIZOLLO et al., 2012; TRAUNER et al., 2014). Contudo não foi representativo para o gene *inhA* (Tabela 3), embora as mutações no gene *inhA* seja menos frequente nos estudos de associação a resistência a Isoniazida (ZHANG & YEW, 2009; GONÇALVES et al, 2012; CAFÉ OLIVEIRA et al., 2016).

Na avaliação dos resultados da qPCR com amostras de isolados de cultivo, apenas o gene *katG* apresentou resultado aceitável de associação a resistência ao fármaco, fato que surpreendeu, considerando que são amostras de DNA com menos interferentes em relação as amostras de escarro.

A provável explicação para estes resultados não satisfatórios pode estar relacionada com o fenômeno da heterorresistência, ou seja, pode albergar populações mistas de bacilos sensíveis e resistentes ao fármaco simultaneamente. Este fenômeno é frequente em *M. tuberculosis*, sendo que o isolado é resistente quando a proporção de colônias resistentes em relação às sensíveis é maior que 1%. Isto faz com que a detecção de DNA com mutações, em menor proporção, seja um desafio com técnicas baseadas em PCR, já que o DNA não mutado

(tipo selvagem) e abundante pode ser amplificado preferencialmente (PHOLWAT, et al., 2013) e, conseqüentemente, o *M. tuberculosis* ser considerado sensível.

Além disso, as mutações podem alterar a função normal dos genes, resultando em taxa de crescimento reduzido das cepas resistentes, que é referido como “custo fitness” (BORREL & GAGNEAUX, 2009). Assim, o desenvolvimento *in vitro* de *M. tuberculosis* resistentes pode ser sobreposta pela população sensível, cujo DNA não mutado seria também amplificado preferencialmente.

Ao avaliar os resultados dos ensaios moleculares, a qPCR em amostras de escarro, para detectar a presença ou ausência de mutações nos genes *katG*, *inhA* e *rpoB* de *M. tuberculosis*, associados a resistência aos principais fármacos antituberculose, observou-se que o resultado foi satisfatório para o gene *katG* associado a resistência a Isoniazida e gene *rpoB* a resistência a Rifampicina. No entanto, o desempenho com Índice *kappa* acima de 0,700 são os desejáveis para as técnicas de diagnósticos. Todavia, é evidente a necessidade de otimização dos ensaios para qPCR e/ou a inclusão de mais regiões dos genes *katG* e *rpoB* associados à resistência para aumentar a concordância do teste, bem como, a busca de outros potenciais genes que podem estar associados a resistência aos fármacos anti-TB.

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos que também utilizaram a qPCR, a partir de amostras de escarro, para detecção de mutação no gene *rpoB*, associado a resistência a Rifampicina (GONÇALVES et al., 2012; PERIZOLLO et al., 2012;).

Para o bom desempenho da qPCR, vários fatores devem ser levados em consideração, a descontaminação das amostras e o método de extração de DNA. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias resistentes em relação às sensíveis, também é necessária uma descontaminação das amostras clínicas que contém microbiota associada, quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos de interesse levando a um resultado falso-negativo (THORTON et al., 1998).

A próxima etapa do estudo seria padronizar testes “quantitativos” para qPCR, que caracterizem melhor as populações de micobactérias resistentes e sensíveis na mesma amostra clínica, embasada nos métodos padrões fenotípicos convencionais, que definem a sensibilidade de acordo com o crescimento bacteriano.

Portanto, os resultados obtidos revelam que apesar de não terem sido satisfatórios, os ensaios moleculares são promissores, importantes na rede pública de saúde por permitir um diagnóstico rápido e com maior sensibilidade. Representa um ganho relevante no tempo de diagnóstico em comparação a cultura. Deste modo, os laboratórios também podem contar com esta ferramenta para o diagnóstico rápido da TB, que seria utilizada em conjunto a baciloscopia direta, tornando-se de grande valia para o tratamento imediato e adequado do paciente com TB pulmonar.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

7.1 Nas 171 amostras testadas pelo Método de Redução de Nitrato (MRN), a frequência de isolados resistentes para Isoniazida (9,36%) foi superior à Rifampicina (5,85%) e também aos dois fármacos combinados (4,09%). Estes resultados são elevados, considerando que foram isolados de casos novos de tuberculose (TB);

7.2 A PCR em Tempo Real (qPCR), a partir de amostras de escarro apresentou resultado não concordante ao MNR (teste padrão deste estudo para detecção de resistência aos fármacos Isoniazida e rifampicina.

7.3 Os genes *katG* e *rpoB* avaliados na qPCR, a partir amostras de escarro, apresentaram “associação significativa” para resistência à Isoniazida e à Rifampicina, respectivamente.

7.4 Não houve concordância entre os testes de qPCR a partir de amostras de escarro e de isolados de cultivo. No entanto, a qPCR, a partir de amostras de escarro, teve uma boa concordância para os genes *katG* e *rpoB*, relacionados a resistência à Isoniazida e à Rifampicina, respectivamente, quando comparada a MNR.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.161, p.1376-1395, 2000.

ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p.167-179, 2008.

ANGEBY, K. A. K.; LISBETH, K.; HOFFNER, S. E. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 553-555, 2002.

ANEK-VORAPONG, R.; SINTHUWATTANAWIBOOL, C.; PODEWILS, L. J.; MCCARTHY, K.; NGAMLERT, K.; PROMSARIN, B.; VARMA, J.K. Validation of the GenoType[®] MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. **Biomed Central Infectious Diseases**, v.10, p.123, 2010.

ARBEX, M. A.; Varella, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; Mello, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, n.5, p. 626-640, 2010.

BARBOSA, T. BCG (Bacille of Calmette-Guerin) revaccination leads to improved *in vitro* IFN gamma; response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**, v.21, p.2152-2160, 2003.

BARREIRA, D.; GRANJEIRO, A. Avaliação das estratégias de controle da TB no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.1, p.4-8, 2007.

BEHR, M. A.; WARREN, S. A. SALAMON, H.; HOPEWELL, P.C.; PONCE DE LEON A.; DALEY.C.L.; SMALL,P.M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **Lancet, London**, v.353, n.9151, p.444-449, 1999.

BLOOM B. R.; MURRAY C. J. L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, Washington, v.257, p.1055-1064, 1992.

BOEHME, C.; NEBETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M.P.; SHEMAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN, J.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMJEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; O'BRIEN, S. M.; PERSING, D. H.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES, C.; ALLAND, D.; PERKINS, M. D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine**, v.363, p.1005-1015, 2010.

BORREL, S.; GAGNEUX, S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal Tuberculosis lung Disease**. vol.13, n.12, p.1456-1466, 2009.

BRAGA, J. U.; WERNECK BARRETO, A.; HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 76-81, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de controle da tuberculose: Situação da Tuberculose no Brasil e no Mundo**. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica Tuberculose**. 7ª ed. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica do Programa de Controle da Tuberculose**. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica do Programa de Controle da Tuberculose**. Trata sobre mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a (Nota Técnica).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica do Programa de Controle da Tuberculose**. Trata sobre mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b (Nota Técnica).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica: Taxa de Incidência** (2012). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2010_atual_31_05_2011.pdf> Acesso em: 17 set 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Controle de Tuberculose. Situação Epidemiológica: Taxa de Incidência**. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Controle de Tuberculose. Situação Epidemiológica: Taxa de Incidência**. Brasília, 2016.

BREWER.; T. F. Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Gue´rin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature. **Clinical Infection Diseases**. vol 31, 2000.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J.S.; PARKER, K. L. GOOGMAN & GILMAN. As bases Farmacológicas da Terapêutica. In: JUNIOR, W. A. P Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v.25, p.169-193, 2000.

CAFE OLIVEIRA, L.N.; MUNIZ-SOBRINHO, J.S.; VIANA-MAGNO, L.A.; MELO, S.C.O.; MACHO, A.; RIOS-SANTOS, F. Detection of Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil using a multimarker genetic assay for *katG* and *rpoB* genes. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. vol. 20, n. 2, p. 166-177, 2016.

CAMINERO, J. A.; DALEY, C. L. Management of Multidrug Resistant Tuberculosis. **Respiratory and Critical Care Medicine**. vol. 34, n. 1, p. 44-49,2013.

CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.7, p.51-64, 1999.

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 15(!), p.29-35, 2006.

CARVALHO, S. C.; MIRANDA, S. S.; PESQUERO, J. L.; GOMES, M. A. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, p.31-38, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, Plan to combat extensively Drug-resistant tuberculosis. Recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. *Morb.Mortal. Report Tuberculosis in the United States*, 2012.

COLDITZ.; G. A.,; BREWER.;T. F.,; BERKEY.; C.S.; WILSON.; M. E.,; BURDICK.; E., MSC; FINEBERG.; H. V.; MOSTELLER.; F. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of Tuberculosis Meta-analysis of the Published Literature. **The Journal of the American Medical Association**. vol. 271, n 9, 1994.

COHEN, T.; SOMMERS, B.; MURRAY, M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet Infectious Diseases**, n. 3, p. 13-21, 2003.

CONDE, M.B, MELO, F.A.F; MARQUES, A.M.C; CARDOSO, N.C; PINHEIRO, V.G.F; DALCIN, P.T.R; MACHADO, Junior A.R; LEMOS, A.C.M., NETTO, A,R; DUROVNI, B; SANT'ANNA, C..C; LIMA, D; CAPONE, D; BARREIRA, D; MATOS, E.D; MELLO, FCQ; DAVID, FC; MARSICO, G; AFIUNE JB; SILVA, JRL; JAMAL LF; TELLES, MAS; HIRATA, MH; RABAHI MF; CAILLEAUX-CESAR, M; PALACI, M; MORRONE, N; GUERRA, RL; DIETZE, R; MIRANDA, SS; CAVALCANTE, SC; NOGUEIRA, SA; NONATO, TSG; MARTIRE, T; GALES, VMN; DETTONI, VV. 2009. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.10, p.1018-1048, 2009.

COUTO-SANT'ANNA, C. et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by score system in children and adolescents: a trial in Reference center in Bahia, Brazil. **Journal of Infectious Disease**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 305-310, 2004.

CHOPRA, I.; BRENNAN, P. Molecular action of anti-mycobacterial agents. **Tubercle and Lung Disease**, v. 78, n. 2, p. 89-98, 1998.

DALCOMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**, v.41, p.34, 2007.

DUCATI, R. G.; NETTO A. R.; BASSO L. A.; SANTOS D.S. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.697-714, 2006.

DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Human Mutation**, v.15, p.7-12, 2000.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>).

FATKENHEUR L.; TAELEMAN H.; SCWENK A.; WENZEL R. The return of tuberculosis. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 34(2), p. 139-146, 1999.

GAGNEUX, S.; TRAUNER, A.; BORRELL, KLAUS REITHER, S.. Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy. **Drugs**. vol. 74, p.1063–1072, 2014

GARRIDO, M. S. R. RAMASAWMY, PEREZ-PORCUNA, T. M. R.; ZARANZA, E. TALHARI, A.C. F. E.; MARTINEZ-ESPINOSA, S. BUHRER-S; EKULA, S. B. Primary drug resistance among pulmonary treatment-naïve tuberculosis patients in Amazonas State, Brazil. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. vol., n 5, p.559–563, 2014.

GILLESPIE, S. H. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.267-274, 2002.

GONÇALVES, M. G. FUKASAWA, L. O.; SALGADO, M. M., OLIVEIRA, R. S. HARRISON, L. H. K. A SHUTT, K. A e SACCHI, C. T.. Fast test for assessing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by real-time PCR. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.; vol. 107, n.7, p. 903–908, 2012.

GUIMARÃES, M. G.; LOBO, A. P.; SIQUEIRA, E. A.; BORGES, Tff.; MELO S. C. C. Tuberculose, HIV e pobreza: tendência temporal no Brasil, Américas e mundo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.38, n.4, 2012.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury,v.6, p.986-994, 1996.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E.; BOHEME, C.; WALLACE, E.; HO, H.; KOP, J.; OWENS, M. R.; RODGERS, R.; BANADA, P.; SAFI, H.; BLAKEMORE, R.; LAN, N.T.N.; JONES-LÓPEZ, E. C.; LEVI, M.; WINN-DEEN, E.; CHRISTEL. L.; DAILEY, M.; WINN-DEEN, E.; CHRISTEL, L.; DAILEY, P.; PERRINS, M. D.; PERSING, D. H.; ALLAND, D. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of on-demand, near-patient technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.1, p.229-239, 2010.

HERMANS, P. W. M.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHITEMA, A. R.; MCADAM, R.A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 2051-2058, 1990.

HILLEMANN, D.; RU SH-GERDES, S.; RICHTER, E.; Evaluation of the genotype MTBDR plus assay for rifampicin and isoniazida susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.8, p.635-2640, 2007.

JACOMELLI, M; SILVA, P. R. A. A.; RODRIGUES, A. J.; DEMARZO, S. E.; SEICENTO, M.; FIGUEIREDO, U. R. Broncoscopia no diagnóstico de tuberculose pulmonar em pacientes com baciloscopia de escarro negativo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.38, n.2, 2012.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S. H. Molecular Methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.781-91. 2003.

KIVI, M. L.; XUEMIN, S.; RAYCHAUDHURI, R.; ALTMAN, B.; SMALL, P. M. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequence with a whole genome microarray IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Microbiology**, v.40, p.2192-2198, 2002.

KOZLOV, M.; NUDLER, E.; NIKIFOROV, V.; MUSTAEV, A. Reactive Rifampicin Derivate Able to Damage Transcription Complex. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, p. 443-447, 2013.

KRITSKI, A.L; CONDE, M. B; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. 3ª ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2005.

LAURENZO, D.; MOUSA, S. A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic. **Acta Tropica**, v.119, p. 5-10, 2011.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. L. Tuberculosis. **Lancet**. v.378, p.57-72, 2011.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. Pratical handbook

LEMOS, L. A.; FEIJÃO, A. R.; GALVÃO, M. T. G. Aspectos sociais e e de saúde de portadores da coinfeção HIV/Tuberculose. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 14(2), p. 364-371, 2013.

LEW JM, KAPOPOULOU A, JONES LM, COLE ST. TubercuList - 10 years after. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2011.

LÖNNROTH, K. et al. Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. **The Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1814-1829, 2009.

MARRAS, S. A. E. Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. **Molecular Biotechnology**, v.38, p. 247-255, 2008.

MDIVANI, N. et al. Monitoring Therapeutic Efficacy by Real-Time Detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in Sputum. **Clinical Chemistry**, New York, v.55, n.9, p.1694–1700, 2009.

MICHELETTI, V. C. et al. Tuberculose resistente em pacientes incluídos no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Antituberculose realizado em Porto Alegre, Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. vol.40, n.2, pp.155-163, 2014.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T.; LIMESCHENKO, E.; STEKLOVA, L.; VYSHNEUSKIV, B. High prevalence of *katG* Ser315Thr substitution among Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from NorthWestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1417-1424, 2002b.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; VYHNEUSKIV, B.; NARUSKAYA, O. Alle-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n.7, p. 2231-2235, 2003

MURRAY, P. **Medical microbiology**. 6^a ed. Philadelphia: Mosby, Elsevier, 2009.

NACHEGA, J. B.; CHAISSON, R. E. Tuberculosis drug resistance: a global threat. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.24-30, 2003.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.33, p.10-13, 2004.

OGUSKU, M. M.; SADAHIRO, A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; ZAITZ, C.; SALEM, J. I. PCR in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. **Braslian Journal Microbiology**. v.34, n.2, 2003

OGUSKU, M. M. Investigação de Tuberculose Pulmonar por infecção Policlonal de *Mycobacterium tuberculosis* e possível associação com a resistência aos fármacos antimicrobianos. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

PRADO, T.N.; GALAVOTE, H.S.; ANA PAULA BRIOSHI., A. P.; THAMY LACERDA. T.; FREGONA.; G.; DETONI.; V. V.;R. C. D. REYNALDO DIETZE; MACIEL.; E. L. N. M. Epidemiological profile of tuberculosis cases reported among health care workers at the University Hospital in Vitoria, Brazil. **Jornal. Brasileiro Pneumologia**. vol.34, n.8 São Paulo, 2008

PERIZOLLO, P. F.; COSTA, E. R. D.; RIBEIRO, A. W.; SPIESC, F. S.; RIBEIRO, M. O.; DIAS, C. F.; UNIS, G.; SILVA, P. A.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P.N.; ROSSET, M. L. R. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis**. Vol. 92, p.56-59, 2012.

PIERRE, C.; LECOSSIER, D.; BOUSSOUGANT, Y.; BOCART, D.; JOLY, V.; YENI, P.; HANCE, A. J. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.4, p.712-717, 1991.

PINHEIRO, R. O.; SAMPAIO, E. P.; DALCOLMO, M. P. Tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis: immunologic mechanisms and tools for controlling the disease. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 2, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://basessibi.c3sl.ufpr.br/brapci/v/18214>>. Acesso em: 01 mes_07a 2016. PORTAL DA SAÚDE.

PHOLWAT, S.; STROUP, S.;FOONGLADDA, S. ; HOUP, E. Digital PCR to Detect and Quantify Heteroresistance in Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**. vol. 8, n. 2, 2013.

QUESNIAUX, v.; FREMOND, C.; JACOBS, M.; PARIDA, S.; NICOLLE, D.; YEREMEEV, V.; BIHL, F.; ERARD, F.; BOTHA, T.; DRENNAN, M.; SOLLER, M-N.; LE

BERT, M.; SCHNYDER, B.; RYFFEL, B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 946–959, 2004.

RIEDER, H. L. Interventions for tuberculosis control and elimination. Paris: **International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)**, p.26, 2002.

ROSSAU, R.; TRAORE, H., DE BEENHOUWER, H.; MIJS, W; JANNES, G.; DE RIJK, PORTAELS F. Evaluation of the INNO-LIPA rifampicin tuberculosis assay: a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.10, p.2093-2098, 1997.

ROSSETTI, M. L. R. Tuberculose Resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.4, p.525-532, 2002.

SBPT, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Vol.35, n.10, p. 1018-1048, 2009.

SANKAR, S. et al. An Appraisal of PCR-Based Technology in the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Diagnosis & Therapy**, Naperville, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2011

SANTOS, L. C; BOUSQUET, H. M; PEREIRA, A. M; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P, KIPNIS, A. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p.1052-1057, 2010.

SALEM, J. I.; GOH, K. S.; LITAIFF, L. R.; CARDOSO, M. S. L.; BRIGLIA, M. F. S. An investigation of *Mycobacterium tuberculosis* in Manaus/Amazonas, Brazil. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, n.1, p. 6-8, 1990.

SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M. M. PKO – Alternative method for isolating *Mycobacterium* from sputum. **Acta Amazônica**, v. 37, n.3, p. 419-424, 2007.

SEMSA - **Secretaria Municipal de Saúde**. Dados sobre Incidência dos casos de Tuberculose em Manaus. Comunicação Pessoal, 2014 - Tabela De Dados. Prefeitura de Manaus, 2014.

Link: <http://semsa.manaus.am.gov.br/semsa-faz-treinamento-sobre-aplicacao-do-teste-rapido-da-tuberculose/>.

SHIMIZU, Y.; DOBASHI, K.; YOSHIKAEA, Y.; YABE, S.; HIGUCHI, S.; KOIKE, V.; MITA, Y.; UTSUGI, M.; ENDOV, K.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, S.; SAITO, R & MORI, M. Five-antituberculosis drug-resistance genes detection using array system. **Journal of clinical Biochemistry and Nutrition**, v.42, p.228-234, 2008.

SILVA, P. F.; MOURA, G. S; CALDAS, A. J. M. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. **Cadernos Saúde Pública**, v.30, n.8, p.1745-1754, 2014.

SOINI, H; MUSSER, J. M. Molecular diagnostics of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v.47, n.5, p.809-814, 2001.

SOMOSKOVI, A.; DORMANDY, J.; MITSANI, D.; RINEVNBURG, J.; SALFINGER, M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based Genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex as well as its resistance to isoniazid and rifampicin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4459-63, 2006.

SOUZA, C.F., ÂNGELA JORNADA BEN.; A. J., SCHNEIDER.; S. M. B, NASCIMENTO.; B. P., NEUMANN.; C. R., OLIVEIRA.; F. J. A. Q. A importância das ações programáticas de saúde no controle da tuberculose: experiência de um serviço de atenção primária à saúde em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Clinical and Biomedical Research**. Porto Alegre. vol. 34, n. 2, p 175-183, 2014.

SOUZA, M. G.; PINHEIRO, E. S. Incidência e Distribuição da Tuberculose na Cidade de Manaus/Am, Brasil. **Revista Geográfica Acadêmica**, v.3, n.2, p.xii, 2009.

SOUZA MB, ANTUNES CMF, GARCIA GF. Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p. 430-437, 2006.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v.28, n.4, p.678-682, 2005.

STEINGART, K. R.; Ng, V.; HENRY, M.; HOPEWELL, P. C; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M. D.; AZIZ, M. A.; PAI, M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v.6, n.10, p. 664-674, 2006.

TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H. L.; Effect of Isoniazid on the In Vivo Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, and Viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.2, p. 29-35, 1972.

TENOVER, F.C.; Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34(5), p. S3-S10, 2006.

TIMMINS, G. S; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. Micro review. **Molecular Microbiology**, v.62, p.1220-1227, 2006.

TORTOLI, E. & MARCELLI, F. Use of the INNO LiPa Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. **European Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 26, p. 51-55, 2007.

THORNTON, C. G. et al. Processing respiratory specimens with C18 carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 36, n. 7, p. 2004-2013, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

VAN EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINICK, T. M.; SMALL, P. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 406-409, 1993.

VALIM, A. R.; ROSSETTI, M. L.; RIBEIRO, M. O.; ZAHA, A. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3119-3122, 2000.

VALASEK MA and Repa JJ. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**.v.29, n3, p151-159, 2005.

VIEDMA, D. G.; INFANTES, M.S.D.; LASALA, F.; CHAVES, F.; ALCALÁ, L. E.; BOUZA, E. New Real Time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance and highlevel isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.988-995, 2002.

WANI, R. L. S. Tuberculosis 2: Pathophysiology and microbiology of pulmonary tuberculosis. **South Sudan Medical Journal**, v.6, n.1, p.10-12, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing. **World Health Organization**, 2010. Geneva: WHO, 2010

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. **Policy statement**. Geneva: WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Plan to Stop TB.2011-2015. Geneva: **World Health Organization**, WHO, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control 2012. Geneva. World Health Statistics 2012. Geneva: WHO, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control 2013. Geneva. World Health Statistics, 2013. Geneva: WHO, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report, World Health Organization, 2014. Geneva: WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report, World Health Organization, 2015. Geneva: WHO, 2015.

YANG, Z.; DURMAZ, R.; YANG, D.; GUNAL, S; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; SANIC, A.; MARRS, C.F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampicin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.53, p.201-208, 2005.

ZANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p.529-564, 2005.

ZANG, Y; YEOW, W. W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.13, n.11, p.1320-1330, 2009.

9. APÊNDICES

9.1. APÊNDICE A: Registro e Ficha de Coleta de dados

FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES		DATA: ___/___/___
N° Registro Laboratório do INPA _____		
N°REGISTRO ESCARRO ___/___		
Nome: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	
Endereço: _____	Fone: _____	
Data de Nascimento: ___/___/___	Idade: _____	Profissão: _____
Cidade onde mora : _____		
Naturalidade _____		
Naturalidade (País): _____	Naturalidade (Avós): _____	
Informações Clínicas: Forma da TB: _____		
BCG: <input type="checkbox"/> Não	PPD: <input type="checkbox"/> Não	Exames de imagens <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Tipo: _____		
<input type="checkbox"/> Sim Data: ___/___/___ <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator		
Resultado: _____		
<input type="checkbox"/> Não sabe informar <input type="checkbox"/> Reator _____ mm		
Antecedente de Tuberculose:		
Pessoal: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quando pela 1ª vez: _____		
Familiar: <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Tios <input type="checkbox"/> Sogros <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Primos <input type="checkbox"/> Cônjuge <input type="checkbox"/> Agregados		
<input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Filho(s) <input type="checkbox"/> Namorado <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Cunhado <input type="checkbox"/> Vizinho <input type="checkbox"/> Não sabe informar		
Resultados anteriores de BAAR <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		
Onde? _____		
Resultado: 1) ___ 2) ___		
Outros exames: _____		
Apresenta ou apresentou outras doenças?		
<input type="checkbox"/> Hanseníase <input type="checkbox"/> Malária <input type="checkbox"/> Doenças auto-imunes <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Bronquite <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Dengue <input type="checkbox"/>		
Tabagismo, quantos cigarros por semana: _____ <input type="checkbox"/> Outra(s) Qual (is)? _____		
Consome bebidas alcóolicas <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim, Qual: <input type="checkbox"/> cerveja (1 dose=330mL) <input type="checkbox"/> vinho (1 dose 100mL) <input type="checkbox"/>		
Destilados (1 dose= 30mL), quantas doses por semana: _____		
Quadro clínico atual:		
<input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Expectoração <input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Dor torácica <input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/>		
Emagrecimento <input type="checkbox"/> Cansaço <input type="checkbox"/> Outros. Quais? _____		
O paciente:		
<input type="checkbox"/> Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual		
<input type="checkbox"/> Está recebendo tratamento desde: _____ Medicação: _____		
Outras informações: _____		

9.2. APÊNDICE B: Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº de Registro na Pesquisa:

Os pesquisadores **Maurício Morishi Ogusku** e **Julia Ignez Salem** pedem sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa "Investigação de Tuberculose pulmonar por múltiplas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Infecção Policlonal) e sua possível associação com a resistência às drogas antimicobacterianas". O projeto será realizado com pacientes que sejam atendidos no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia que fica na Av. André Araújo 2936, Bairro do Aleixo em Manaus e na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes. Serão realizados exames de laboratório no escarro (catarro) dos pacientes com tosse para descobrir se tem a doença tuberculose. O escarro é coletado em um frasco, não dói e nem prejudica a saúde. Veja como é:



Os pesquisadores vão fazer 2 tipos de exames no escarro:
1. Baciloscopia - vão colocar um pouco numa lamina e olhar no microscópio para procurar a "bactéria" da tuberculose



2. Cultivo - vão colocar em tubos com comida para fazer a "bactéria" crescer

Se os pesquisadores encontrarem a bactéria da tuberculose vão utilizá-la para realizar um teste chamado Antibiograma. Isso é, vão tentar descobrir por dois diferentes exames se a bactéria que está causando a tuberculose é resistente ou não aos remédios que serão dados pelos médicos para seu tratamento. Depois os pesquisadores vão analisar qual dos exames é o melhor para descobrir se a bactéria é resistente ou não aos remédios. O paciente não receberá nenhum benefício em dinheiro ou bem material em troca e a bactéria e as amostras de escarro serão guardadas na coleção de Microbiologia do INPA, que poderá utilizá-los em outros estudos. Se tiver um paciente que não queira participar da pesquisa, os exames também serão realizados apenas para saber se está doente de tuberculose e se tem que ser tratado. Os resultados da pesquisa serão informados diretamente ao paciente, que mesmo após aceitar participar, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pelos pesquisadores. Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os participantes. Se o paciente quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa basta se dirigir ao INPA ou telefonar para (92) 3643-3216 que os pesquisadores darão todas as informações.

Eu, _____, entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto para descobrir se a "bactéria" que está causando a Tuberculose no meu corpo é resistente ou não ao tratamento que vou receber dos médicos. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....
Assinatura do paciente

...../...../.....
Data

Impressão do polegar, caso o paciente não saiba escrever seu nome.

Nome do profissional que conversou com o paciente

Data:/...../.....

9.2. APÊNDICE C: Equipe Científica

Integrantes:

Nome	Formação	Título	Órgão	Atividade
Aya Sadahiro	Farmacêutica	Doutor	UFAM	Orientador
Maurício Morishi Ogusku	Farmacêutico	Doutor	INPA	Coorientador
Suelen Ennes das Neves	Farmacêutica	Especialista	UFAM	Mestranda
Irineide Assumpção Antunes	Médica	Mestre	SUSAM	Assessoria na seleção dos pacientes
Joycenéa Matsuda da Silva	Médica	Mestre	ILMD	Assessoria na seleção dos pacientes
João Raimundo S. de Souza	Biólogo	Mestre	INPA	Apoio técnico
Fernanda O. do Nascimento	Graduanda	-	UFAM	Iniciação Científica

UFAM: Universidade Federal do Amazonas; ILMD: Instituto Leônidas e Maria-Deane-Fiocruz Amazônia; SUSAM – Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas, Policlínica Cardoso Fontes.

9.3. APÊNDICE D: ORÇAMENTO

Lista dos Materiais Permanente e Consumo.

Tipo	Item	Especificação do Item	Qtd	Valor Unit.	Valor Total
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Agitador de tubos tipo vórtex	1	R\$ 344,00	R\$ 344,00
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Agitador magnético com aquecimento	1	R\$ 1.200,00	R\$ 1.200,00
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Estufa incubadora B.O.D.	1	R\$ 4.644,00	R\$ 4.644,00
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Freezer vertical, 231 litros	1	R\$ 1.744,00	R\$ 1.744,00
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Refrigerador duplex, 365 litros	1	R\$ 1.769,00	R\$ 1.769,00
Capital	Material Permanente e Equipamentos	Termociclador em Tempo-Real (Real-Time PCR)	1	R\$ 50.299,00	R\$ 50.299,00
Subtotal - Capital R\$:					R\$ 60.000,00
Custeio	Material de Consumo	Agarose grau biologia molecular, 500g	4	R\$ 1.556,00	R\$ 6.224,00
Custeio	Material de Consumo	Cartucho SmartPack para ultrapurificação de água	2	R\$ 1.993,00	R\$ 3.986,00
Custeio	Material de Consumo	Corante Sybr Green para DNA, frasco com 400 uL	10	R\$ 441,00	R\$ 4.410,00
Custeio	Material de Consumo	DNA ladder 100pb, frasco 50 uL	10	R\$ 227,00	R\$ 2.270,00
Custeio	Material de Consumo	DNA ladder 123 pb, frasco 50 uL	10	R\$ 244,00	R\$ 2.440,00
Custeio	Material de Consumo	dNTP Mix 100mM	5	R\$ 886,00	R\$ 4.430,00
Custeio	Material de Consumo	Filtro HEPA para cabine de segurança biológica	2	R\$ 2.888,00	R\$ 5.776,00
Custeio	Material de Consumo	Fucsina básica, frasco c/ 100 g	5	R\$ 79,00	R\$ 395,00
Custeio	Material de Consumo	Glutamato-L Monossódico Monohidratado P.A., frasco c/ 100g	5	R\$ 46,00	R\$ 230,00
Custeio	Material de Consumo	Isoniazida, frasco 50 g	2	R\$ 86,00	R\$ 172,00
Custeio	Material de Consumo	Jogo de micropipetas ajustáveis P10, P100, P200 e P1000	2	R\$ 2.855,00	R\$ 5.710,00
Custeio	Material de Consumo	Luvas de procedimentos, tamanho M, caixa c/ 100 unidades	36	R\$ 28,00	R\$ 1.008,00
Custeio	Material de Consumo	Luvas de procedimentos, tamanho P, caixa c/ 100 unidades	24	R\$ 28,00	R\$ 672,00

Custeio	Material de Consumo	Máscara de proteção (respirador) tipo N95	500	R\$ 4,55	R\$ 2.275,00
Custeio	Material de Consumo	Microtubo 0,1 mL óptico para RT-PCR, pacote c/ 1000 und	5	R\$ 378,00	R\$ 1.890,00
Custeio	Material de Consumo	Microtubo 0,2 mL, pacote c/ 1000 und	5	R\$ 226,00	R\$ 1.130,00
Custeio	Material de Consumo	Microtubos 1,5 mL, pacote com 500 und	20	R\$ 66,00	R\$ 1.320,00
Custeio	Material de Consumo	Mix para RT-PCR, 1000 reações	2	R\$ 1.800,00	R\$ 3.600,00
Custeio	Material de Consumo	Oligonucleotídeos liofilizados e sondas fluorescentes	10	R\$ 356,00	
Custeio	Material de Consumo	Oligonucleotídeos liofilizados	10	R\$ 267,00	R\$ 2.670,00
Custeio	Material de Consumo	Parafilm M, rolo 10,2 cm x 38,1 m	2	R\$ 93,00	R\$ 186,00
Custeio	Material de Consumo	Ponteiras com filtro 10 uL, pacote c/ 1000	12	R\$ 267,00	R\$ 3.204,00
Custeio	Material de Consumo	Ponteiras com filtro 1000 uL, pacote c/ 1000	10	R\$ 267,00	R\$ 2.670,00
Custeio	Material de Consumo	Ponteiras com filtro 20 uL, pacote c/ 1000	12	R\$ 267,00	R\$ 3.204,00
Custeio	Material de Consumo	Ponteiras com filtro 200 uL, pacote c/ 1000	15	R\$ 267,00	R\$ 4.005,00
Custeio	Material de Consumo	Proteinase K, frasco 100 mg	10	R\$ 340,00	R\$ 3.400,00
Custeio	Material de Consumo	Rifampicina, frasco 5 g	5	R\$ 1.267,00	R\$ 6.335,00
Custeio	Material de Consumo	Software Office 2013	1	R\$ 1.079,00	R\$ 1.079,00
Custeio	Material de Consumo	Software Windows 8	1	R\$ 610,00	R\$ 610,00
Custeio	Material de Consumo	Tampão Loading Buffer 10X, frasco c/ 3 mL	10	R\$ 197,00	R\$ 1.970,00
Custeio	Material de Consumo	Taq DNA Polimerase, frasco c/ 500U	20	R\$ 356,00	R\$ 7.120,00
Custeio	Material de Consumo	Tris (Hidroximetil) Aminometano P.A., frasco 1000 g	3	R\$ 213,00	R\$ 639,00
Custeio	Material de Consumo	Tubo de ensaio de vidro 16x160, tampa de rosca	3000	R\$ 3,25	R\$ 9.750,00
Custeio	Material de Consumo	Tubos de centrífuga 15 mL, descartável, esterilizado, pacote com 50 unidades	50	R\$ 63,00	R\$ 3.150,00
Custeio	Material de Consumo	Tubos de centrífuga 50 mL, descartável, esterilizado, pacote com 25 unidades	30	R\$ 45,00	R\$ 1.350,00
Custeio	Outros	Despesas com importação de equipamento Termociclador Tempo-Real	1	R\$ 7.544,00	R\$ 7.544,00
Subtotal - Custeio R\$:					R\$ 110.384,00
Total Geral R\$:					R\$ 170.384,00

Observação: Este projeto de dissertação está vinculado ao projeto maior do PPSUS

10. ANEXOS

**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE
PESQUISAS COM SERES HUMANOS**

IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa nº:	221-09	Data de entrada:	26/08/09
Título do Projeto:	Investigação de Tuberculose pulmonar por múltiplas cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Infecção Policlonal) e sua possível associação com a resistência às drogas antimicobacterianas		
Áreas do Conhecimento:	2. Ciências Biológicas		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	fev 2010	Data de Término:	fev 2012
		Valor Orçamento:	R\$ 130.000,00
Pesquisador Responsável:	Maurício Morishi Ogusku		
Financiamento:	Não:	Sim: <input checked="" type="checkbox"/>	Órgão: submetido para financiamento
Currículos no CNPq:	todos		
Currículos anexos ao Projeto:	Não		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto:	<p>O estado do Amazonas tem se destacado como detentor de uma das maiores taxas de incidência de Tuberculose (TB) do Brasil, ou seja, 67,6/100.000 habitantes. Vários fatores contribuem para a manutenção dessa incidência: clima tropical, desnutrição, condições precárias de moradia e saneamento básico, além das dificuldades operacionais de diagnóstico e tratamento da TB. Adicionado a esse panorama, em alguns países, há relatos de ocorrência de infecções tuberculosas policlonais, ou seja, o mesmo indivíduo sendo portador de diferentes cepas ou clones de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com padrões distintos de sensibilidade às drogas, o que pode comprometer o sucesso do tratamento. Diante desse panorama, o objetivo principal do presente estudo será investigar a infecção policlonal em indivíduos acometidos de TB e verificar a sensibilidade aos antimicobacterianos dos distintos clones de <i>M. tuberculosis</i>.</p>		

Objetivos (conforme Projeto de Pesquisa)

4. OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META (acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade)		
OBJETIVOS	METAS	Indicador (Quantitativo)
Investigar a infecção policlonal em indivíduos acometidos de TB pulmonar e verificar a sensibilidade aos antimicrobianos dos distintos clones de <i>M. tuberculosis</i>	1. Genotipar as cepas de <i>M. tuberculosis</i> caracterizadas em uma infecção policlonal provenientes de indivíduos com Tuberculose pulmonar (casos novos e em casos previamente tratados).	20 pacientes 200 colônias isoladas
	2. Verificar a associação de um padrão genotípico em casos de infecção policlonal e cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistente às drogas.	
	3. Detectar a associação de um padrão genotípico em casos de infecção policlonal em pacientes paucibacilíferos e multibacilíferos.	
	4. Identificar as mutações genéticas associadas à resistência aos antimicrobianos isoniazida e rifampicina em cepas de <i>M. tuberculosis</i> , caracterizadas em infecções policlonais, isoladas de indivíduos com TB pulmonar.	

PARECER FINAL

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo teve a indicação de APROVAÇÃO.

Indicação: APROVAR

Comentários:

O protocolo atende as exigências da Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia do produto final do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicitamos que a mesma seja entregue até MAIO/2012.

Data de liberação do Parecer: 30/11/09 na 52ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,


Dra. Sílvy de Souza Costa
Coordenadora do CEP-INPA
PO nº 246/2009